

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

COMITÉ DE REDACTION

D^r CALMETTE, directeur de l'Institut Pasteur de Lille ;
D^r CHANTEMESSE, professeur à la Faculté de Médecine ;
D^r LAVERAN, membre de l'Institut de France ;
D^r L. MARTIN, directeur du service de Sérothérapie ;
P^r METCHNIKOFF, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r ROUX, directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r VAILLARD, membre de l'Académie de Médecine.

QR

1

A475

v.29

1915

PER

TOME VINGT-NEUVIÈME

1915

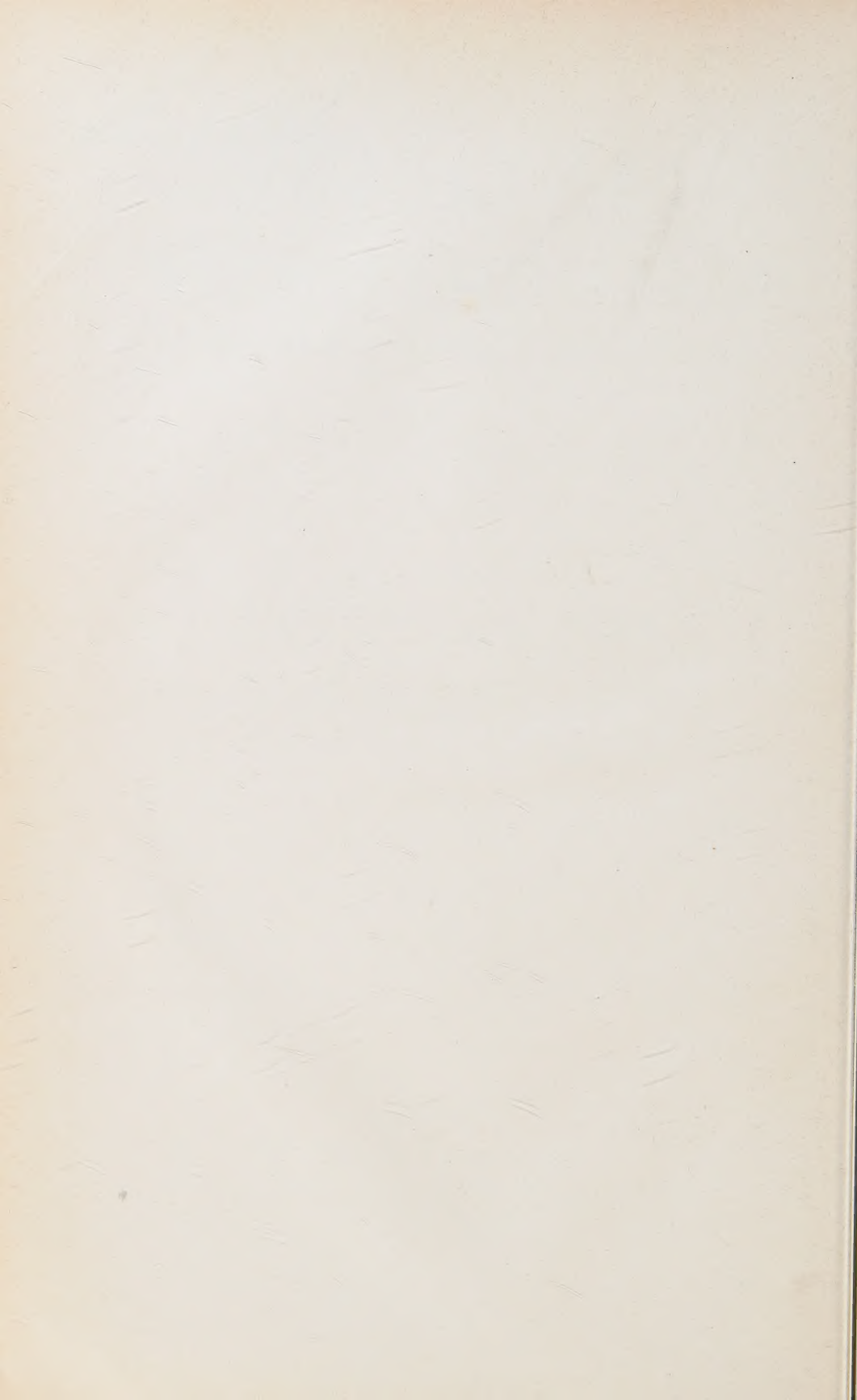
AVEC 11 PLANCHES

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e).



ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LES LEISHMANIOSES CHEZ LES ANIMAUX

par A. LAVERAN

III. — INFECTIONS EXPÉRIMENTALES PRODUITES CHEZ DIFFÉRENTES ESPÈCES ANIMALES PAR LA *LEISHMANIA DONOVANI* (1)

On a admis, pendant plusieurs années, qu'un des principaux caractères différentiels du kala-azar méditerranéen et du kala-azar indien était fourni par ce fait que la première de ces maladies était inoculable à certains animaux, notamment au singe et au chien, qui se montraient rétractaires à la deuxième. Cette opinion n'est plus soutenable aujourd'hui. Il est démontré que la *L. Donovanii*, agent du kala-azar indien, est inoculable, comme la *L. infantum*, agent du kala-azar méditerranéen, à certaines espèces animales. Nous aurons à voir si les conditions d'inoculation et les maladies expérimentales provoquées par les deux virus sont identiques ou non.

Une autre différence, très intéressante au point de vue spécial qui nous occupe, subsiste entre le kala-azar méditerranéen et le kala-azar indien. On a vu, dans la première partie de ce travail, que la leishmaniose canine naturelle a été observée à

(1) Voir, pour les premières parties du travail, ces *Annales*, t. XXVIII, p. 823 et p. 883.

l'état enzootique dans tous les pays où le kala-azar méditerranéen est endémique et que vraisemblablement l'agent du kala-azar chez l'homme et chez le chien est le même; or les recherches poursuivies dans l'Inde pour y découvrir des foyers de leishmaniose canine ont été infructueuses jusqu'ici.

Donovan a examiné à Madras, du mois de mai au mois d'août 1909, 1.150 chiens au point de vue de la présence dans leur rate de la *L. Donovan*; 256 de ces chiens provenaient du quartier de Madras dans lequel l'endémie de leishmaniose est la plus forte, et cependant l'existence des parasites n'a été notée dans aucun cas (1).

Des recherches ultérieures de Donovan et de Patton ont abouti également à des résultats négatifs; sur plus de 2.000 chiens tués à la fourrière de Madras, on n'a constaté aucun cas de leishmaniose (2).

Mackie rapporte que 93 chiens ont été tués dans les villages du Nowgong (Inde) où le kala-azar régnait avec intensité dans les maisons où il y avait des malades, et que la rate et la moelle osseuse de ces chiens ont été examinées avec résultat négatif, au point de vue de l'existence des *Leishmania*; la moelle osseuse d'un certain nombre de chiens a été inoculée, également avec résultat négatif, à 2 singes, à 2 *Pteropus Edwardsi* et à un chien (3).

Korke, qui a examiné un grand nombre de frottis de moelle osseuse et de rate de chiens dans l'Inde aurait vu, dans 4 cas, des éléments ayant une grande ressemblance avec des *Leishmania* (4).

Castellani a observé, à Colombo (Ceylan), quelques cas de leishmaniose canine naturelle, mais, comme beaucoup de chiens de Colombo sont importés, il n'a pas conclu de ces faits à l'existence de la maladie à Ceylan (5).

Bahr a recherché, sans succès, le kala-azar chez les indigènes

(1) C. DONOVAN, *Lancet*, 20 novembre 1909.

(2) C. DONOVAN, W.-S. PATTON, *Proc. of the third meeting of the gen. malaria Committee held at Madras*, novembre 1912, Simla, 1913.

(3) F.-P. MACKIE, *Indian Jl. of med. Research*, avril 1914, p. 654.

(4) Sir PARDEY LUKIS, *All India sanitary Conference Lucknow*, janvier 1914. Supplém. au *Indian Jl. of med. Research*, Calcutta, 1914.

(5) A. CASTELLANI et A.-J. CHALMERS, *Manual of trop. Medicine*, 2^e édit., 1913, p. 363.

de Ceylan; il pense que la leishmaniose canine ne se rencontre pas non plus dans cette région (1).

Le kala-azar indien a été inoculé avec succès au chien, au chacal, aux macaques, au *Petropus Edwardsi* (chauve-souris), à la souris et au rat.

Les procédés d'inoculation sont les mêmes que pour le kala-azar méditerranéen; il est nécessaire d'employer de fortes doses du virus; c'est probablement parce que Donovan et Patton avaient inoculé à leurs animaux de trop faibles doses que leurs premiers essais ont été négatifs (2).

CHIEN. CHACAL. — En 1912, Donovan a annoncé qu'il avait réussi à infecter un jeune chien en lui inoculant une forte quantité (3 c. c. 1/2) du sang splénique d'un sujet arrivé à la période terminale du kala-azar. A l'autopsie du chien, on ne trouva de *Leishmania* ni dans la rate, ni dans le foie, mais les parasites étaient nombreux dans la moelle osseuse (3). Il est à remarquer que chez 2 chiens inoculés antérieurement par Donovan, et chez les chiens examinés à Madras au point de vue de la leishmaniose naturelle, l'examen histologique de la moelle osseuse, siège d'élection des *Leishmania*, n'avait pas été fait.

En même temps que Donovan, Patton a réussi à inoculer au chien le kala-azar indien. Sur 8 chiens inoculés avec de fortes quantités du produit du broyage de la rate de malades morts du kala-azar depuis quelques heures, 4 se sont infectés; 3 chiens ont eu de fortes infections; chez l'un d'eux, l'infection sanguine était remarquable; trois jours avant la mort on compta plus de 500 *Leishmania* dans un frottis de sang, un seul polynucléaire en renfermait 12; deux jours avant la mort, on compta jusqu'à 1.000 parasites dans un frottis du sang périphérique (4).

Patton a profité de ce cas remarquable d'infection sanguine

(1) P.-H. BAHR, *Transact. of the Soc. of trop. med. a. hyg.*, janvier 1914, t. VII, p. 114.

(2) W.-S. PATTON, *Parasitology*, décembre 1908 et mars 1909, *Transact. of the Soc. of trop. med. a. hyg.*, février 1909 et *Lancel*, 30 janvier 1909.

(3) C. DONOVAN, *Proceed. of the third meeting of the gen. malaria Committee held at Madras*, novembre 1912, Simla, 1913 et *The indian Jl. of med. Research*, juillet 1913, t. I, n° 1.

(4) W.-S. PATTON, mêmes indications que pour les travaux de Donovan mentionnés ci-dessus.

pour faire une expérience très intéressante au point de vue du rôle des puces dans la transmission de la maladie (1).

Plusieurs centaines de puces, *Ct. felis* (2), furent nourries sur le chien, quatre jours avant sa mort, et le contenu du tube digestif de plus de 200 de ces puces fut examiné. Patton résume comme il suit les résultats de l'expérience. Deux heures après l'ingestion du sang par les puces, on trouve dans l'intestin moyen, et dans les fèces de ces insectes, des *Leishmania* incluses dans des leucocytes. Beaucoup de parasites paraissent être déjà en voie de dégénérescence. Quatre heures après, les leucocytes sont dégénérés et les parasites devenus libres ne montrent aucun signe de développement; au contraire, ils deviennent granuleux. Six heures après, il y a une diminution marquée du nombre des parasites, et ceux qui existent encore sont fortement altérés. Un petit nombre de parasites se colorant faiblement sont trouvés dans la partie terminale du tube digestif. Huit heures après, il est très difficile de trouver un seul parasite, et chez toutes les puces examinées à des époques plus éloignées on n'en trouve plus aucun.

Ces faits, qui sont en contradiction avec ceux relatés par Basile (3), tendraient à prouver que la *L. Donovan*i ne peut pas se développer chez *Ct. felis*, et par suite que cet insecte ne joue aucun rôle dans la propagation du kala-azar; il est vrai de dire que Basile a expérimenté sur *L. infantum* et non sur *L. Donovan*i et *Ct. canis*.

Un chacal (sur 4 inoculés) présenta une forte infection.

Patton insiste avec raison sur ce fait que, pour obtenir de bons résultats dans les inoculations du kala-azar aux animaux, il faut employer de fortes doses de virus.

Wenyon, à Londres, a infecté un chien avec la pulpe de la rate d'un Indien mort de kala-azar à l'hôpital Albertdock (4).

Grâce à l'obligeance du D^r Row, de Bombay, j'ai pu entreprendre à Paris des expériences sur différents animaux avec la *L. Donovan*i (5).

(1) W.-S. PATTON, *Indian Jl. med. Research*, juillet 1914.

(2) A Madras, la puce du chien est *Ct. felis* (Bouché).

(3) V. première partie de ce travail, *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. XXVIII, p. 831.

(4) C.-M. WENYON, *Transact. of the Soc. of trop. med. a. hyg.*, janvier 1914.

(5) A. LAVERAN, *Acad. des Sciences*, 17 novembre 1913 et 14 avril 1914.

Le 2 mai 1913, j'ai reçu un tube de culture qui avait été ensemencé par le D^r Row, à Bombay, le 29 mars précédent, avec une culture de *L. Donovan* ayant subi une série de passages, depuis le mois de décembre 1912; le tube contenait encore quelques flagellés mobiles qui, repiqués sur milieu de Novy simplifié, donnèrent de belles cultures; ce sont ces cultures qui ont été utilisées pour mes expériences.

On s'accorde à reconnaître qu'il est plus difficile d'infecter des animaux avec les cultures de *Leishmania* qu'avec le produit du broyage de la rate ou de la moelle osseuse d'hommes ou d'animaux morts du kala-azar; néanmoins, mes expériences sur les chiens, et surtout sur les singes, ont souvent donné des résultats positifs.

Sur 12 chiens inoculés uniquement avec des cultures de la *L. Donovan* dans le foie ou dans les veines, 5 se sont infectés (Obs. 1 à 5); les chiens 1, 2 et 3 n'ont reçu, dans les veines ou dans le foie, que 2 cent. cubes de culture, le chien 4 a reçu, dans le foie, 3 cent. cubes de culture. A la vérité, les infections ont été légères, mais j'avais choisi comme étant plus sensibles au virus des chiens très jeunes, et plusieurs d'entre eux ont succombé à des broncho-pneumonies, trop rapidement après l'inoculation pour laisser au kala-azar le temps d'évoluer.

Les formes légères, latentes, sont communes dans les infections du chien dues à la *L. Donovan*, comme dans celles que produit la *L. infantum*, si bien que, sur le cadavre, pour reconnaître l'existence de la maladie, il est parfois nécessaire de faire des ensemencements de la moelle osseuse ou de la rate.

Il est à noter que 2 chiens (Obs. 1 et 5) ont présenté de l'opacité des cornées, passagère dans un cas (1), permanente dans l'autre; on a vu dans la deuxième partie de ce travail que ce symptôme avait été noté également chez des chiens infectés avec la *L. infantum*.

Sur 3 chiens inoculés à la fois avec des cultures et avec le produit du broyage de la rate et du foie d'un macaque fortement infecté de kala-azar indien, 2 se sont infectés et chez un

(1) A. LAVERAN, *Soc. de path. exotique*, 9 juillet 1913. Présentation du chien qui fait l'objet de l'observation 1 du présent travail.

de ces animaux l'infection a été de moyenne intensité (*Leishmania* non rares dans la rate, très rares dans le foie).

Comme dans les infections produites chez le chien par la *L. infantum*, c'est dans la moelle osseuse qu'on a le plus de chances de trouver les *Leishmania* quand il s'agit d'infections légères; l'observation 7 fait toutefois exception à la règle.

Je résume les 7 observations.

1° Un jeune chien, pesant 4 kilogr. 480, reçoit le 10 juin 1913, dans l'une des veines saphènes, 2 cent. cubes d'une culture très belle de *Leishmania Donovan*. — 8 juillet, le chien pèse 4 kilogr. 500; on constate que la cornée du côté gauche s'est opacifiée; la cornée était en très bon état lors de l'arrivée du chien au chenil; elle a dû s'opacifier rapidement, car le chien est souvent examiné. — 13 juillet, la partie externe de la cornée gauche est redevenue transparente. — 16 juillet, l'opacité de la cornée a encore diminué, elle n'occupe plus que le quart interne environ. — 18 juillet, le chien maigrit, il ne pèse plus que 4 kilogr. 100.

Mort le 19 juillet. Le tissu conjonctif a une teinte ictérique très marquée; les urines donnent la réaction de Gmelin. La rate pèse 6 gr. 50. Foie d'aspect normal. Ganglions mésentériques augmentés de volume. Petites ecchymoses sous-pleurales, broncho-pneumonie bien caractérisée qui, certainement, a été la cause de la mort. Rien d'anormal au cœur. Dans les frottis de moelle osseuse, on trouve des *Leishmania* très rares. L'examen des frottis du foie et de la rate est négatif.

2° Un chien âgé de 45 jours, pesant 840 grammes, reçoit, le 30 juin 1913, dans le foie, 2 cent. cubes d'une belle culture de la *L. Donovan*. — 12 juillet, le chien pèse 920 grammes. — Les jours suivants le chien présente les symptômes de la maladie des jeunes chiens et il meurt le 21 juillet.

Le chien pèse 860 grammes; la rate pèse 2 gr. 30. Foie pâle, d'aspect grasseux. Les autres viscères ne présentent pas d'altération macroscopique notable. Dans les frottis de moelle osseuse et de rate, on trouve des *Leishmania* très rares; l'examen d'un frottis du foie est négatif.

3° Un chien âgé de 1 mois environ, pesant 1 kilogr. 080, reçoit le 25 juillet 1913, 2 cent. cubes de culture très belle de *L. Donovan*, moitié dans le foie, et moitié dans une des veines saphènes. Le chien pèse 1 kilogr. 500 le 10 août, 2 kilogr. 100 le 31 août, 2 kilogr. 250 le 23 septembre, 3 kilogr. 450 le 25 octobre. — Le 28 octobre, le chien a des convulsions, il respire difficilement, et présente de la parésie du train postérieur; il s'agit probablement de la maladie des jeunes chiens.

Le chien est sacrifié le 29 octobre 1913; il pèse 3 kilogr. 470. La rate, d'aspect normal, pèse 10 grammes. Les autres viscères ne présentent pas de lésions macroscopiques. Dans les frottis de moelle osseuse, on trouve des *Leishmania* très rares. L'examen des frottis de rate et de foie est négatif. Deux tubes du milieu de Novy simplifié sont ensemencés avec la moelle osseuse; à la date du 19 novembre, on constate une belle culture de flagellés dans un des tubes, l'autre tube est resté stérile.

4° Un chien, âgé de 40 jours, du poids de 1 kilogr. 300, reçoit le 4 août 1913, dans le foie, 1 cent. cube d'une culture très riche de *L. Donovanii*. — 10 août, le chien, qui pèse 1 kilogr. 400, est inoculé une deuxième fois ; il reçoit, dans le foie, 2 cent. cubes d'une culture très riche. — 31 août, le chien va très bien, il pèse 1 kilogr. 840. — 23 septembre, le chien pèse 2 kilogrammes ; il ne paraît pas malade. — 25 septembre, le chien est pris brusquement de mouvements convulsifs, il reste couché sur le côté gauche ; quand on le place sur le côté droit, il se retourne de l'autre côté.

Le chien est sacrifié le 25 septembre. La rate pèse 7 grammes. Le foie, les reins, le tube digestif, le cœur, les poumons ne présentent rien d'anormal. Les méninges cérébrales sont vivement injectées du côté gauche.

Les frottis de moelle osseuse montrent quelques *Leishmania* ; les frottis de rate et de foie n'en montrent pas. Deux tubes du milieu de Novy simplifié, ensemencés avec la moelle osseuse, donnent de belles cultures de flagellés caractéristiques.

5° Une jeune chienne pesant 6 kilogr. 700 reçoit, les 24 et 26 novembre et le 6 décembre 1913, des injections intraveineuses de cultures très belles de *L. Donovanii*. — 9 décembre, on constate que la cornée gauche est trouble. — 10 décembre, la cornée gauche est presque complètement opaque ; conjonctivite double. — 13 décembre, la conjonctivite va bien, mais la cornée droite s'est opacifiée à son tour. Le chien y voit encore un peu. Amaigrissement, poids : 5 kilogr. 700. — 15 décembre, les cornées redeviennent transparentes. — 20 décembre, le chien ne pèse plus que 5 kilogr. 200 ; l'opacité des cornées augmente de nouveau.

Le chien qui paraît très malade est sacrifié le 21 décembre 1913 ; il pèse 4 kilogr. 750. La rate pèse 11 grammes. Les autres viscères ne présentent aucune altération macroscopique. Dans les frottis de la moelle osseuse on trouve des *Leishmania* très rares. Les examens des frottis du foie et de la rate sont négatifs.

6° Un chien âgé de 3 semaines environ, pesant 700 grammes, reçoit dans le foie, le 19 juillet et le 31 août 1913, des injections de cultures très belles de *L. Donovanii*, 2 cent. cubes environ à chaque injection. — Au mois de novembre 1913, le chien est en très bon état, il pèse 4 kilogrammes. — Le 8 novembre, on inocule dans le foie le produit du broyage de la rate et du foie d'un singe infecté de kala-azar indien. — Le chien continue à augmenter de poids ; il pèse, le 9 janvier 1914, 7 kilogrammes ; le 27 février, 8 kilogrammes. Trouvé mort le 3 mars 1914.

Le chien pèse 6 kilogr. 900 ; la rate pèse 6 grammes. Les viscères ne présentent pas d'altérations pouvant expliquer la mort qui est due sans doute à la maladie des jeunes chiens. Les urines sont albumineuses. *Leishmania* très rares dans les frottis de rate et de moelle osseuse. L'examen d'un frottis du foie est négatif.

7° Un jeune chien pesant 6 kilogr. 500 reçoit, le 12 décembre 1913, dans le foie, une injection de 4 cent. cubes du produit du broyage de la rate et du foie d'un singe fortement infecté de kala-azar indien ; le produit du broyage a été dilué dans un peu d'eau physiologique. Le chien reçoit en outre, les 22 et 30 décembre 1913, deux injections intraveineuses de très belles cultures de la *L. Donovanii* ; chaque injection est de 2 cent. cubes. Le chien pèse, le 30 décembre, 7 kilogr. 250 ; le 27 février 1914, 8 kilogrammes ; le 16 mars,

8 kilogr. 100 ; le 14 avril, 8 kilogr. 200 ; le 19 juin, 9 kilogr. 200 ; le 2 août, 8 kilogr. 300. Le chien est sacrifié en bon état le 2 août 1914.

La rate pèse 17 grammes, sa consistance est normale. Les autres viscères abdominaux ou thoraciques ne présentent pas d'altérations macroscopiques. La moelle des os est rouge, diffluente. *Leishmania* non rares dans les frottis de la rate, très rares dans les frottis du foie ; l'examen d'un frottis de moelle osseuse est négatif.

SINGES. — Le *Macacus sinicus* s'infecte facilement quand on lui inocule le virus du kala-azar indien ; le *M. sinicus* de la



La figure reproduit la photographie du *M. sinicus* inoculé par Row avec une culture de la *L. Donovanii*. On distingue un bouton formant une forte saillie de chaque côté du front. Je dois la photographie reproduite ici à l'obligeance du Dr Row.

petite variété des environs de Madras est, d'après Row, plus sensible que le *M. sinicus* de la grande variété de Bombay ; on peut obtenir aussi des résultats satisfaisants avec le *M. cynomolgus*.

D'après les recherches de R. Row, les inoculations de la *L. Donovanii* au *M. sinicus* donnent lieu tantôt à des infections localisées, tantôt à des infections généralisées (1).

Deux *M. sinicus* ont été inoculés au front par Row, l'un dans

(1) R. Row, *Brit. med. Assoc.*, Liverpool, juillet 1912 ; *Jl. tropical med. a hyg.*, 1^{er} novembre 1912 et 1^{er} janvier 1913 ; *Indian Jl. of med. Research*, avril 1914.

la peau scarifiée avec, pour virus, la pulpe de rate d'un homme mort du kala-azar, l'autre par injection sous-cutanée d'une culture de 5^e passage du même virus humain.

Chez le premier macaque on a vu apparaître, après une incubation de 3 mois 1/2 à 5 mois, 3 nodules cutanés qui se sont développés aux points d'inoculation et on a trouvé des *Leishmania*, en petit nombre, dans ces nodules qui avaient la structure de jeunes fibromes. L'infection locale n'a pas été suivie chez le singe d'une infection générale.

Chez le second macaque (inoculé avec la culture) on vit se développer au bout de 5 mois un nodule de chaque côté du front (fig. ci-contre), aux points d'inoculation, avec des *Leishmania* non rares. Le singe a guéri et n'a pas présenté d'infection générale.

Un troisième macaque, inoculé avec le virus d'un des nodules du premier singe, a eu également une infection localisée (nodule cutané).

Un des nodules du deuxième singe a été excisé une quinzaine de jours après son apparition et une de ses moitiés, broyée dans 1 cent. cube d'eau salée à 6 p. 100, a servi à inoculer, dans le péritoine, 2 souris et un *M. sinicus*. Ces 3 animaux ont eu des infections générales, sans lésion locale, avec nombreuses *Leishmania* dans les organes; chez le singe, on a trouvé des *Leishmania* dans le foie 5 mois après l'inoculation; chez les souris, au bout de 6 semaines.

Les meilleurs résultats (lésions localisées et généralisées) ont été obtenus par Row chez le *M. sinicus* (petite variété de Madras) avec des cultures vieilles contenant principalement des éléments arrondis en *cocci*. L'injection intrapéritonéale des cultures, si elle est suivie de succès, produit toujours l'infection généralisée, l'injection sous-cutanée produit tantôt une lésion localisée (nodule), tantôt une infection généralisée.

Les cultures deviennent de moins en moins actives à mesure que le nombre des repiquages augmente, mais on peut maintenir leur virulence en les renouvelant sur les animaux infectés.

Ces expériences de Row ont un double intérêt; elles montrent : 1° qu'on peut provoquer chez le *M. sinicus* des infections généralisées avec la *L. Donovanii*, comme avec la *L. infantum*; 2° qu'avec la *L. Donovanii* on peut obtenir, chez le même animal, des lésions cutanées (non suivies d'infection générale) qui ont

une grande ressemblance avec les lésions expérimentales de la *L. tropica*; nous aurons l'occasion de revenir sur ce point dans une autre partie de ce travail.

Sur 11 *Macacus sinicus* inoculés par Patton avec la pulpe splénique de malades morts de kala-azar depuis quelques heures, 4 se sont infectés; 3 ont présenté une forte infection (1).

Les singes qui avaient reçu de très fortes doses de pulpe splénique se sont seuls infectés; ils ont eu des infections généralisées.

Korke a répété avec succès, aux Indes, les expériences de Row sur les singes (2). Le 11 janvier 1913, à Bombay, dans le laboratoire de Row, 2 *M. sinicus* ont été inoculés, l'un dans le péritoine, l'autre sous la peau, avec le produit de la ponction du foie d'un singe infecté de kala-azar. Korke a emporté ces deux singes à Madras, en même temps qu'un macaque qui, inoculé par Row dans la peau, présentait un nodule cutané riche en *Leishmania*.

Le *M. sinicus* inoculé, à Bombay, dans le péritoine, ne montrant pas de signes d'infection, est réinoculé le 2 septembre 1913, sous la peau, des deux côtés du front, avec la moelle osseuse d'un sujet mort de kala-azar. Treize jours après l'inoculation, des nodules apparaissent aux points d'inoculation et, dans ces nodules, on trouve des *Leishmania*.

Le singe inoculé le 11 janvier 1913, à Bombay, sous la peau, ne présentant pas de signes d'infection, est réinoculé sous la peau, à Madras, avec le sang d'un sujet ayant des *Leishmania* non rares dans le sang; pas de nodules aux points d'inoculation, mais, à l'autopsie, *Leishmania* dans la rate et la moelle osseuse; donc infection généralisée après inoculations sous-cutanées.

Le troisième singe provenant de Bombay et porteur d'un nodule a montré, à l'autopsie, des *Leishmania* dans le nodule, dans la rate et dans la moelle osseuse; il y a donc eu, dans ce cas, infection locale et infection générale, probablement consé-

(1) W.-S. PATTON, *Proceed. of third meeting of the gen. malaria Committee held at Madras*, novembre 1912, Simla, 1913. Je tiens compte des expériences additionnelles.

(2) VISHNU T. KORKE, *Third All India sanitary Conference*, Lucknow, janvier 1914 et *Indian Jl. of med. Research*, avril 1914.

cutive, car les *Leishmania* étaient rares dans la rate et dans la moelle osseuse.

Korke cite encore les faits suivants : un *M. sinicus* inoculé le 26 mai 1913, des deux côtés du front, avec la moelle osseuse d'un sujet mort du kala-azar, à Madras, a, au mois d'août, des nodules aux points d'inoculation et, dans ces nodules, on trouve des *Leishmania*. Chez 2 *M. sinicus*, les résultats de l'inoculation sous-cutanée au moyen de sang ou de pulpe de rate de sujets atteints de kala-azar ont été négatifs.

Sur 5 *M. rhesus*, inoculés dans le péritoine, Mackie note deux succès ; un essai d'infection par ingestion qui a porté sur 2 singes a échoué (1).

J'ai dit plus haut, à propos des infections expérimentales du chien, comment j'avais réussi à instituer des recherches sur la virulence de la *L. Donovanii* pour différentes espèces animales.

Mes expériences sur les singes ont porté sur 7 *M. sinicus* et sur 9 *M. cynomolgus*.

3 *M. sinicus* inoculés dans le foie avec le produit du broyage des viscères d'animaux infectés de kala-azar se sont infectés, et chez 2 d'entre eux l'infection a été forte.

4 *M. sinicus* inoculés dans le foie avec des cultures de la *L. Donovanii* se sont infectés, et 2 d'entre eux ont eu des infections fortes.

7 *M. sinicus* inoculés se sont donc tous infectés et, chez 4 d'entre eux, l'infection a été forte.

De 3 *M. cynomolgus* inoculés dans le foie, avec le produit du broyage des viscères d'animaux infectés de kala-azar, 2 se sont infectés, et l'un d'eux a eu une infection forte.

De 6 *M. cynomolgus* inoculés dans le foie avec des cultures de la *L. Donovanii*, 3 se sont infectés, et chez l'un d'eux l'infection a été forte.

De 9 *M. cynomolgus* inoculés, 5 se sont donc infectés, ce qui donne une proportion de succès moins forte que pour les *M. sinicus*, mais encore belle.

Les singes inoculés avec le produit du broyage de la rate et du foie de singes infectés ont reçu, dans le foie, 4 cent. cubes

(1) F.-P. MACKIE, *Indian Jl. of med. Research*, avril 1914, p. 653.

de la pulpe des viscères délayée dans un peu d'eau physiologique.

Les singes inoculés avec les cultures ont reçu 4 à 8 cent. cubes de cultures, en deux ou trois injections, dans le foie.

J'ai injecté presque toujours des cultures jeunes, de quinze jours environ; j'ai essayé une fois comparativement, chez 2 *M. cynomolgus*, les cultures jeunes et les cultures vieilles. Un des singes, qui fait l'objet de l'observation 8, résumée plus loin, a reçu trois injections dans le foie de cultures de 15 jours, il a présenté une infection légère; l'autre singe a reçu, dans les mêmes conditions que le premier, et aux mêmes doses, trois injections de cultures de 30 jours, il ne s'est pas infecté.

L'infection donne lieu en général, chez les singes, à des symptômes plus apparents que chez les chiens. L'amaigrissement est le signe le plus constant avec l'hypertrophie de la rate qui peut être constatée facilement, sur le singe vivant, quand elle est bien marquée. A la dernière période, les singes s'anémient, ils n'ont plus la vivacité habituelle de leurs mouvements et restent blottis dans un coin de leur cage; ils perdent l'appétit et sont souvent pris de diarrhée.

Sur les 12 singes qui se sont infectés, 3 seulement sont morts de leishmaniose, 91 jours, 152 jours et 169 jours après l'inoculation; les autres singes sont morts de complications ou bien ils ont été sacrifiés à différentes périodes de l'infection.

La lésion la plus commune, constatée à l'autopsie chez les singes infectés, est l'hypertrophie de la rate. Chez 9 singes, d'un poids moyen de 1 kilogr. 250, infectés par la *L. Donovanii*, le poids moyen de la rate a été de 7 gr. 23, notablement supérieur au poids normal qui, chez les singes de 1 kilogramme à 1 kilogr. 250 ne dépasse pas 2 à 3 grammes. Chez un singe de 1 kilogr. 500, la rate, fortement hypertrophiée, pesait 14 grammes (Obs. 3); chez un singe de 1 kilogr. 350, le poids de la rate était de 41 grammes (Obs. 4) et chez un singe de 950 grammes, de 10 gr. 50 (Obs. 10); dans d'autres cas, le poids de la rate s'éloignait peu du poids normal.

Sur 11 singes chez lesquels j'ai recherché les *Leishmania* dans la rate, le foie et la moelle osseuse, j'ai noté : parasites très nombreux ou nombreux dans la rate, le foie et la moelle osseuse, 4 fois; parasites assez nombreux dans la rate et la

moelle osseuse, rares dans le foie 1 fois; parasites assez nombreux dans la rate, rares dans le foie et la moelle osseuse, 1 fois; parasites rares dans la rate et la moelle osseuse, examen du foie négatif, 2 fois; parasites rares dans la rate, examens du foie et de la moelle osseuse négatifs 2 fois; enfin, dans un cas, les examens de la rate, du foie et de la moelle osseuse ont été négatifs, mais l'ensemencement de la moelle osseuse dans le milieu de Novy simplifié a donné des cultures de flagellés caractéristiques (Obs. 9).

Il ressort de cette étude que c'est dans la rate et ensuite dans la moelle osseuse que les *Leishmania* ont été trouvées le plus souvent et en plus grand nombre; le foie ne vient qu'en troisième ligne.

Ce qui a été dit précédemment au sujet du diagnostic des infections produites par la *L. infantum* chez le singe s'applique exactement au diagnostic des infections dues à la *L. Donovanii*. Lorsqu'un singe qui a été inoculé avec le virus du kala-azar indien maigrit, et que sa rate présente une hypertrophie manifeste, on peut en conclure avec toutes probabilités qu'il s'est infecté. Mais ces signes ne sont pas constants et, alors même qu'ils existent, il faut, pour confirmer le diagnostic, procéder à la recherche des *Leishmania*. La ponction du foie ne donne de bons résultats que lorsqu'il s'agit d'infections très fortes, avec de nombreux parasites dans le foie. L'examen direct du sang permet quelquefois de constater l'existence des *Leishmania*. L'ensemencement du sang constitue un bon procédé de diagnostic. J'ai procédé 2 fois à cet ensemencement avec le sang du cœur, chez des singes qui venaient d'être sacrifiés, et en ensemençant chaque fois 2 tubes avec 10 gouttes de sang j'ai obtenu dans les deux cas de belles cultures de flagellés (Obs. 4 et 10); cependant, dans un de ces cas, il s'agissait d'une infection légère avec parasites rares, dans la rate seulement. Sur le cadavre, lorsque l'examen des frottis de la rate, du foie et de la moelle osseuse est négatif, ou ne révèle que l'existence de *Leishmania* très rares, parfois assez mal caractérisées, il est indiqué de faire des ensemencements de moelle osseuse sur le milieu de Novy simplifié, comme cela a été fait chez les singes qui font l'objet des observations 1, 8 et 9.

Des singes sacrifiés en bon état, plusieurs mois après l'ino-

culation, ont été notés comme ayant des infections légères qui paraissaient en voie de guérison. Il ne paraît donc pas douteux que les infections du singe par la *L. Donovanii* peuvent, comme les infections dues à la *L. infantum*, se terminer par guérison.

Je résume les observations de 7 *M. sinicus* et de 3 *M. cynomolgus* inoculés avec succès, dans mon laboratoire, avec le virus du kala-azar indien.

1^o Un *Macacus sinicus*, du poids de 1 kilogr. 850, reçoit le 10 juin 1913, dans le foie, 4 cent. cubes d'une culture très riche de *L. Donovanii*. — 30 juin, le singe a maigri, il ne pèse plus que 1 kilogr. 650. — 21 juillet, le singe a repris son poids primitif de 1 kilogr. 850. — 29 juillet, la rate est un peu augmentée de volume. Le singe reçoit encore, dans le foie, 2 cent. cubes d'une culture riche de *L. Donovanii*. — 18 août, le singe a beaucoup maigri, il ne pèse plus que 1 kilogr. 480. — 30 août, l'amaigrissement continue, le singe est moins vif, il mange moins qu'à l'ordinaire, diarrhée.

Le singe est trouvé mort le 9 septembre, il ne pèse plus que 1 kilogr. 200. La rate pèse 2 kilogr. 30. Foie pâle. Petites ulcérations sur la muqueuse du côlon. Poumons pâles. Anémie et maigreur extrêmes.

Dans les frottis colorés de la moelle osseuse et de la rate, *Leishmania* très rares. On ne trouve pas de *Leishmania* dans les frottis du foie.

La moelle osseuse ensemencée, le 9 septembre, sur le milieu de Novy simplifié, donne, le 23 septembre, une belle culture de flagellés, bien caractérisés, qui est repiquée avec succès en série.

2^o Un *M. sinicus*, du poids de 1 kilogr. 850, reçoit le 10 juin 1913, dans le foie, 4 cent. cubes d'une culture très riche de *L. Donovanii*. — 30 juin, le singe a maigri, il pèse 1 kilogr. 710. — 28 juillet, l'amaigrissement s'accroît, le singe ne pèse plus que 1 kilogr. 550. — 18 août, poids : 1 kilogr. 500; injection, dans le foie, de 2 cent. cubes d'une culture très riche de *L. Donovanii*. — 30 septembre, poids : 1 kilogr. 500; injection, dans le foie, de 2 cent. cubes d'une culture très riche de *L. Donovanii*. — 5 novembre, le singe a encore un peu maigri, il ne pèse plus que 1 kilogr. 400; il est moins vif qu'à l'ordinaire; on le trouve presque toujours blotti dans un coin de sa cage; il mange peu. La rate est légèrement augmentée de volume.

Le singe est trouvé mort le 9 novembre. Il pèse 1 kilogr. 400. La rate pèse 7 grammes, elle est dure. Foie d'aspect normal. Reins pâles. Rien à noter du côté du cœur ni des poumons.

Dans les frottis de la rate, du foie et de la moelle osseuse, on trouve des *Leishmania* en grand nombre. Beaucoup de cellules du foie et de la moelle osseuse sont bourrées d'éléments parasitaires caractéristiques. Dans le foie, les *Leishmania* siègent principalement dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins.

3^o Un *M. sinicus*, du poids de 1 kilogr. 300, est inoculé à trois reprises, dans le foie, avec des cultures très riches de la *L. Donovanii* de Bombay. Les inoculations sont faites les 26 juin, 12 juillet et 6 septembre 1913, chaque fois avec 2 cent. cubes du liquide de culture. Le singe ne maigrit pas, il pèse le

30 septembre 1 kilogr. 500; même poids le 14 novembre. Au mois de novembre, on note une anémie très marquée (décoloration des muqueuses).

Le singe est trouvé mort le 12 décembre 1913; il pèse 1 kilogr. 500. Le foie et la rate sont hypertrophiés; la rate pèse 14 grammes, sa consistance est très ferme. Reins, poumons très pâles (anémie). Moelle osseuse diffluente.

Les *Leishmania* nombreuses dans les frottis de rate et de moelle osseuse sont assez nombreuses dans les frottis de foie.

4° Un *M. sinicus* pesant 1 kilogr. 100 reçoit à trois reprises les 5, 17 et 29 janvier 1914, dans le foie, des injections de très belles cultures de la *L. Donovanii*; on injecte chaque fois 2 cent. cubes environ de culture jeune (15 jours environ). Le singe pèse, le 6 février, 1 kilogr. 150; le 3 mars, 1 kilogr. 235; le 3 avril, 1 kilogr. 250; le 25 mai, 1 kilogr. 260; le 10 juin, 1 kilogr. 300. A partir du mois d'avril, on note une légère augmentation de volume de la rate. Le singe est sacrifié, en bon état, le 19 juin 1914.

Le singe pèse 1 kilogr. 350. La rate qui est augmentée de volume pèse 11 grammes; sa consistance est plus grande qu'à l'état normal. Rien d'autre à noter à l'examen macroscopique.

L'examen histologique des frottis de rate révèle l'existence de *Leishmania* rares. L'examen des frottis du foie et de la moelle osseuse est négatif.

Deux tubes du milieu de culture de Novy simplifié sontensemencés le 19 juin, chacun avec 10 gouttes du sang du cœur; le 7 août, on constate l'existence de flagellés caractéristiques dans les deux tubes; le sang du singe contenait donc des *Leishmania* bien que l'infection fût légère (peu avancée ou plutôt en voie de régression).

5° Un *M. sinicus* du poids de 1 kilogr. 150 est inoculé le 12 janvier 1914, dans le foie, avec une forte dose du produit du broyage de la rate et du foie du *M. cynomolys* qui fait l'objet de l'observation 11. Le singe est trouvé mort le 3 février 1914; il a maigri, son poids n'est plus que de 920 grammes. La rate pèse 2 gr. 80. Le foie, les reins, le tube digestif ne présentent rien d'anormal. Foyers de pneumonie à droite. Péricarde, cœur à l'état normal. *Leishmania* typiques, non rares, dans les frottis de rate et de moelle osseuse, rares dans les frottis de foie.

Un tube du milieu de Novy simplifié,ensemencé le 3 février, avec la moelle osseuse, donne le 18 février une belle culture de flagellés.

6° Un *M. sinicus*, pesant 1 kilogr. 560, reçoit le 4 mars 1914, dans le foie, 4 cent. cubes du produit du broyage de la rate et du foie d'un singe fortement infecté de kala-azar indien; le produit du broyage est dilué dans un peu d'eau physiologique. — Le singe pèse, le 24 mars, 1 kilogr. 650; le 3 avril, 1 kilogr. 400; le 25 mai, 1 kilogr. 500. — Le 26 mai 1914, le macaque meurt à la suite d'un brusque refroidissement de la singerie.

La rate, légèrement hypertrophiée, pèse 8 grammes; sa consistance est augmentée. Les autres viscères ne présentent aucune altération macroscopique. On trouve des *Leishmania*, non rares, dans les frottis de la rate; très rares dans les frottis du foie et de la moelle osseuse. Un tube du milieu de Novy simplifié,ensemencé avec la moelle osseuse, donne à la date du 9 juin une très belle culture de formes flagellées de la *Leishmania*.

7° Un *M. sinicus* pesant 1 kilogr. 330 reçoit le 4 mars 1914, dans le foie, 4 cent. cubes de la bouillie fournie par le broyage de la rate et d'une portion

du foie d'un singe fortement infecté de kala-azar; le produit du broyage est mélangé à un peu d'eau physiologique. — Le singe pèse, le 24 mars, 1 kilogr. 300; le 25 mai, 1 kilogr. 250. Le 9 avril, on note une légère hypertrophie de la rate. — 26 mai, à la suite d'un brusque refroidissement de la singerie, le macaque est trouvé mourant, il meurt le 27 mai. La rate pèse 8 grammes; sa consistance est augmentée. Les autres viscères ne présentent pas d'altérations macroscopiques. *Leishmania* rares dans les frottis de la rate et de la moelle des os. L'examen des frottis du foie est négatif.

8° Un *M. cynomolgus* pesant 1 kilogr. 725 reçoit à trois reprises, les 28 février, 14 et 20 mars 1914, dans le foie, des injections de très belles cultures de la *L. Donovanii*; on injecte chaque fois 2 cent. cubes environ de culture jeune. — Le singe pèse, le 24 mars, 1 kilogr. 700; le 14 avril, 1 kilogr. 760; le 25 mai, 1 kilogr. 770; le 20 juin, 1 kilogr. 800. Le singe est sacrifié en bon état le 4 juillet 1914.

Le singe pèse 1 kilogr. 980. Les viscères ne présentent rien d'anormal à l'examen macroscopique; la rate n'est pas hypertrophiée.

Dans les frottis de rate, on trouve des *Leishmania* très rares; l'examen histologique des frottis de foie et de moelle osseuse est négatif, mais deux tubes du milieu de Novy simplifié,ensemencés avec la moelle osseuse du singe, le 4 juillet, donnent de belles cultures de *Leishmania* à la date du 23 juillet.

9° Un *M. cynomolgus*, pesant 1 kilogr. 550, reçoit à deux reprises, dans le foie, les 29 mai et 4 juin 1914, des injections de très belles cultures de la *L. Donovanii*; on injecte chaque fois 2 cent. cubes de culture de trois semaines. — 10 juin, le singe a maigri, il ne pèse plus que 1 kilogr. 350. — 13 juillet, le singe, toujours malade, pèse 1 kilogr. 300. Mort le 27 juillet avec de la diarrhée.

Le singe pèse 1 kilogr. 260. La rate, petite, ne pèse que 1 gr. 50. Matières liquides dans toute la hauteur du tube digestif. Le foie, les reins et les viscères thoraciques ne présentent aucune altération apparente. L'examen histologique des frottis de rate, de foie et de moelle osseuse ne révèle l'existence d'aucune *Leishmania*, mais deux tubes du milieu de Novy simplifiéensemencés le 27 juillet avec la moelle osseuse donnent, à la date du 11 août, de belles cultures de *Leishmania*.

10° Un *M. cynomolgus* mâle, du poids de 1 kilogramme, reçoit à trois reprises, les 18 octobre, 12 novembre et 9 décembre 1913, dans le foie, de 1 à 2 c. c. 50 de cultures très belles de *L. Donovanii*. — 10 décembre, le singe pèse 1 kilogr. 120, il ne paraît pas malade. — 13 janvier 1914, le poids est de 1 kilogr. 280. — 2 février, le singe a maigri, il ne pèse plus que 1 kilogr. 020. — 26 février, l'amaigrissement fait des progrès; le singe ne pèse plus que 950 grammes. Anémie marquée, muqueuses décolorées.

Le singe est sacrifié le 4 mars 1914. La rate, qui est hypertrophiée, pèse 10 gr. 50; sa consistance est augmentée. Foie gros. Reins normaux. Cœur normal. Poumons très pâles. Anémie très marquée. Moelle osseuse rougeâtre, semi-liquide. Dans les frottis colorés de la rate, du foie et de la moelle osseuse, on trouve de nombreuses *Leishmania*.

Deux tubes du milieu de Novy simplifié,ensemencés avec le sang du cœur (10 gouttes de sang dans chaque tube), donnent, au bout de quinze jours, de belles cultures de flagellés caractéristiques.

Etant donné, d'une part, que l'identité de *L. Donovanii* et de *L. infantum* n'est pas encore complètement démontrée, et d'autre part, qu'une première atteinte de kala-azar méditerranéen donne au singe, comme au chien, une immunité solide contre cette maladie (1), il était indiqué de rechercher si un singe guéri d'une infection due au kala-azar méditerranéen pourrait être infecté à l'aide du kala-azar indien; j'ai pu réaliser cette expérience, comme le prouvent les observations qui suivent.

11° Un *M. cynomolgus*, du poids de 1 kilogr. 200, est inoculé, le 8 novembre 1913, avec le produit du broyage du foie et de la rate d'un *M. sinicus* fortement infecté à la suite d'inoculations de cultures de la *L. Donovanii* provenant de Bombay. Le singe maigrit à la suite de cette inoculation, il ne pèse plus le 10 décembre que 1 kilogramme.

Le singe est trouvé mort le 12 janvier 1914, il pèse 1 kilogramme. La rate et le foie sont légèrement augmentés de volume. Moelle osseuse rouge, fluide. Rien d'autre à noter. Dans les frottis de moelle osseuse, de rate et de foie, on trouve des *Leishmania* typiques, en grand nombre.

12° Un *M. cynomolgus*, femelle, du poids de 2 kilogr. 500, est inoculé le 24 avril 1909, avec le virus du kala-azar tunisien. Le 30 octobre 1909, l'animal est splénectomisé; la rate pèse 19 grammes, elle contient des *Leishmania* rares, décelées par la culture. Le 23 août, la guenon qui est en très bon état est réinoculée, sans résultat, avec une très forte dose du virus tunisien. Le 8 août 1911, la guenon met bas un petit qui s'élève bien. Le 8 novembre 1913, la guenon est inoculée, dans le foie, avec le virus du kala-azar indien, dans les mêmes conditions que le *M. cynomolgus* qui fait l'objet de l'observation précédente. La guenon pèse 2 kilogr. 300; elle ne présente rien d'anormal à la suite de l'inoculation.

La guenon est sacrifiée en très bon état le 7 février 1914; elle pèse 2 kilogr. 280. La rate a été enlevée complètement. Il n'y a pas d'hypertrophie compensatrice des ganglions lymphatiques. On ne trouve de *Leishmania* ni dans les frottis de la moelle osseuse, ni dans ceux du foie. La moelle osseuse estensemencée largement dans deux tubes du milieu de Novy simplifié, les deux tubes restent stériles.

Un *M. cynomolgus* ayant l'immunité pour le kala-azar méditerranéen s'est donc montré réfractaire au kala-azar indien, alors qu'un *M. cynomolgus*, inoculé dans les mêmes conditions que le premier et servant de témoin, contractait une infection rapidement mortelle (2); cette expérience fournit, ce

(1) C. NICOLLE et C. COMTE, *Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1910, 3^e fasc., p. 103.

(2) A. LAVERAN, *Acad. des Sciences*, 14 avril 1914, *Comptes rendus*, t. CLVIII, p. 1060.

me semble, un puissant argument en faveur de l'identité des deux virus.

PTEROPUS EDWARDSI. — Cette chauve-souris, qui est commune dans l'Inde, est désignée par les auteurs anglais sous le nom de *flying fox*; d'après Mackie, elle est assez sensible au kala-azar; sur 4 *Pteropus* inoculés par Mackie avec le virus du kala-azar indien, par voie intrapéritonéale, 2 se sont infectés et l'un d'eux a eu une infection généralisée (Mackie, *op. cit.*).

SOURIS. — On a vu plus haut que Row a réussi à infecter 2 souris blanches en leur inoculant, dans le péritoine, le virus fourni par le broyage dans l'eau physiologique d'une partie d'un nodule cutané d'un *M. sinicus*; le nodule du singe était survenu à la suite de l'inoculation d'une culture du virus humain du kala-azar indien. L'une des souris mourut 46 jours après l'inoculation, l'autre fut sacrifiée 49 jours après l'inoculation; chez les deux souris des *Leishmania* existaient, en grand nombre, dans la rate, dans le foie et dans la moelle osseuse.

Une troisième souris, inoculée dans le péritoine avec une très petite quantité du suc fourni par le nodule cutané du même macaque, et sacrifiée au bout de 3 mois environ, était atteinte aussi d'une infection généralisée (1).

Row, ayant obtenu facilement des infections généralisées chez la souris blanche avec le virus fourni par un macaque, se flattait, avec raison, d'obtenir plus facilement encore des infections des souris à l'aide du virus fourni par les souris infectées; il n'en a rien été et il est arrivé (comme moi pour la *L. infantum*) à cette conclusion que la *L. Donovanii* perdait une partie de sa virulence en passant par la souris. On verra dans une autre partie de ce travail que la virulence de la *L. tropica*, agent du bouton d'Orient, semble au contraire augmenter chez la souris.

Row a réussi également à infecter des souris blanches avec des cultures de la *L. Donovanii*; les résultats de ses expériences se résument ainsi : les inoculations sous-cutanées de cultures ne produisent pas de lésions locales; après une longue période

(1) R. Row, *Jl. of trop. med. a. hyg.*, novembre 1912 et 1^{er} janvier 1913.

d'incubation, on observe souvent des lésions généralisées; une souris sacrifiée 14 mois après l'inoculation avait une forte infection (rate, foie, moelle osseuse); les inoculations intrapéritonéales produisent plus rapidement l'infection généralisée. La période d'incubation (ou plutôt de latence) est de 5 mois $1/2$ environ (1).

D'après Row, la souris grise (sauvage) serait réfractaire au kala-azar indien.

Sur 11 souris blanches inoculées par Mackie (*op. cit.*) dans le péritoine, 3 se sont infectées.

Sur 15 souris blanches inoculées par moi, 5 se sont infectées; elles avaient reçu toutes les 5, dans le péritoine, du virus provenant du broyage de la rate et du foie de singes infectés avec la *L. Donovan*i; l'infection a été d'intensité moyenne dans 1 cas (Obs. 1), légère dans les autres cas.

3 souris inoculées dans le péritoine avec des cultures de la *L. Donovan*i, de 15 jours environ, ne se sont pas infectées; 2 souris inoculées dans le péritoine avec des cultures vieilles de 4 mois ne renfermant plus que des formes arrondies, avec des flagellés très rares, ne se sont pas infectées non plus, comme on pouvait s'y attendre; je ne les fais pas entrer en ligne de compte.

Chez des souris sacrifiées 8 à 12 mois après l'inoculation, et chez lesquelles l'examen histologique des viscères et de la moelle osseuse ne révélait pas l'existence de *Leishmania*, la rate a été trouvée notablement hypertrophiée, ce qui paraît indiquer qu'il y avait eu infection et que les souris avaient été sacrifiées tardivement.

Je résume les observations des 5 souris blanches qui, inoculées avec le produit du broyage de la rate et du foie d'un singe atteint de kala-azar indien, se sont infectées.

1^o Une souris adulte est inoculée à 2 reprises, dans le péritoine, aux mois de juin et juillet 1913 avec de très belles cultures de la *L. Donovan*i. Le 8 novembre 1913, la souris qui est en très bon état est inoculée, dans le péritoine, avec le produit du broyage du foie et de la rate d'un singe infecté de kala-azar indien. — 29 décembre 1913, la souris est malade, il y a de la parésie du train postérieur.

La souris est sacrifiée le 29 décembre; elle pèse 23 grammes; la rate,

(1) R. Row, *Indian Jl. of med. Research*, avril 1914.

fortement hypertrophiée, pèse 25 centigrammes. On trouve des *Leishmania* non rares dans les frottis de la rate, rares dans les frottis du foie et de la moelle osseuse.

2° Une jeune souris est inoculée le 8 novembre 1913, dans le péritoine avec le produit du broyage de la rate et du foie d'un singe infecté de kala-azar indien. — 30 décembre, la souris pèse 18 grammes; la rate paraît grosse.

La souris est sacrifiée le 10 janvier 1914; elle pèse 17 grammes; la rate notablement hypertrophiée pèse 22 centigrammes. On trouve des *Leishmania*, très rares, dans les frottis de la rate; l'examen des frottis du foie et de la moelle osseuse est négatif.

3° Une souris adulte est inoculée le 9 novembre 1913, dans le péritoine, avec le produit du broyage de la rate et du foie d'un singe infecté de kala-azar indien. — 30 décembre, la souris pèse 25 grammes; la rate paraît augmentée de volume. — 27 mars 1914, la souris a maigri, elle ne pèse plus que 19 grammes.

La souris est sacrifiée le 29 mars 1914; elle pèse 19 grammes; la rate, notablement hypertrophiée, pèse 21 centigrammes. Les ganglions inguinaux ont augmenté de volume. On trouve des *Leishmania* très rares dans les frottis de la rate; l'examen des frottis du foie et de la moelle osseuse est négatif.

4° Une souris adulte est inoculée le 12 janvier 1914, dans le péritoine, avec le produit du broyage de la rate et du foie d'un singe infecté de kala-azar indien. La souris qui est en bon état est sacrifiée le 31 août 1914; elle pèse 20 grammes; la rate est grosse, elle pèse 22 centigrammes. On trouve des *Leishmania* très rares dans les frottis de la rate et de la moelle osseuse. L'examen d'un frottis du foie est négatif.

5° Une souris adulte est inoculée le 5 mars 1914, dans le foie, avec le produit du broyage de la rate et du foie d'un singe infecté de kala-azar indien. Le 27 mars, la souris pèse 27 grammes; le 10 avril, elle ne pèse plus que 20 grammes, elle est visiblement malade, le poil est piqué, la souris se met en boule; elle meurt le 20 avril.

On constate à l'autopsie une anémie profonde. Foie et poumons très pâles. La rate pèse 20 centigrammes. *Leishmania* très rares dans les frottis de rate. Examen négatif des frottis de foie et de moelle osseuse.

RATS. — Patton a réussi à infecter un rat blanc (sur 17 inoculés) en lui injectant, dans le péritoine, 3 cent. cubes d'une émulsion faite avec la rate d'un sujet mort de kala-azar indien; l'infection du rat était généralisée (*Leishmania* dans la rate et dans le foie) (1).

De 7 rats blancs inoculés dans le péritoine par Mackie (*op. cit.*) aucun ne s'est infecté.

Le rat paraît donc être très peu sensible au virus du kala-azar indien.

(1) W.-S. PATTON, *Scientif. Mem. by Offic. of the med. a. sanit. Dep. of the Gov. of India*, 1912, N. 5, n° 53, p. 33, note; *Indian Jl. of med. Research*, juillet 1913, t. I, n° 1.

COBAYE. LAPIN. CHAT, etc. — D'après Row, le cobaye et le lapin sont réfractaires à la *L. Donovan*.

Mackie a inoculé sans succès un chat, dans le péritoine, avec le virus du kala-azar indien.

J'ai injecté, à différentes reprises, des cultures de la *L. Donovan* dans le péritoine de 3 *Meriones Shawi* et de 3 *Gerbillus hirtipes* provenant de Tunisie; aucun de ces animaux ne s'est infecté.

En résumé, on produit avec la *L. Donovan*, comme avec la *L. infantum*, des infections généralisées chez le chien, chez certains singes et chez la souris blanche, plus difficilement chez le rat. Les mêmes procédés d'inoculation sont applicables aux deux virus et les infections provoquées présentent de très grandes ressemblances au point de vue des symptômes, de l'évolution et des lésions. On ne peut donc plus, pour contester l'identité des 2 virus, objecter que les animaux sensibles à la *L. infantum* sont réfractaires à la *L. Donovan*. Il y a lieu toutefois de noter les différences suivantes : le chien se montre moins sensible au kala-azar indien qu'au kala-azar méditerranéen et la leishmaniose canine naturelle, observée dans tous les pays où le kala-azar méditerranéen est endémique, n'a pas encore été signalée dans les régions de l'Inde les plus éprouvées par la leishmaniose humaine; d'autre part, Row et Korke ont provoqué, chez des macaques, des lésions locales en inoculant, dans le derme ou sous la peau, du virus du kala-azar indien, tandis que les essais d'inoculation de la *L. infantum* faits dans ces conditions ont échoué jusqu'ici.

Un *M. cynomolgus* qui avait acquis l'immunité pour le kala-azar méditerranéen a été inoculé sans succès avec le virus du kala-azar indien, alors qu'un macaque témoin contractait une infection rapidement mortelle.

Je n'entends pas tirer de ce dernier fait, qui est unique, une conclusion ferme, mais il me semble incontestable qu'il fournit un argument de grande valeur en faveur de l'identité de la *L. infantum* et de la *L. Donovan*.

(A suivre.)

ADAPTATION DES MICROBES (FERMENT LACTIQUE)

AU MILIEU

par CHARLES RICHET.

Ce mémoire a pour but d'établir un fait qui avait été soupçonné et même établi depuis longtemps, mais qui n'avait pas reçu, semble-t-il, de solution précise, peut-être parce qu'au lieu de s'adresser à des organismes simples, dont la vie est rapide, on avait pris des organismes supérieurs, compliqués, à lente évolution. Dans un être complexe, comme une plante phanérogame, ou un insecte, ou un mammifère, on ne peut suivre bien longtemps le développement de plusieurs générations successives, tandis qu'avec des organismes monocellulaires, qui donnent, en 24 heures, 40 ou 50 générations, quelques jours équivalent à quelques siècles, au point de vue de la transformation par l'hérédité.

On avait cependant déjà pu démontrer l'adaptation des microbes, en prouvant que, par des cultures successives sur un certain milieu, les microbes s'habituent à ce milieu, mais jamais encore on n'avait pu donner de chiffres précis pour établir les conditions et les degrés de cette accoutumance.

Et en effet la propriété pathogène d'un microbe, ou même l'intensité de sa coloration, sont des données difficiles (impossibles) à représenter par des chiffres, tandis qu'avec la fermentation lactique on arrive à des chiffres exacts : un degré d'acidité qui comporte une précision remarquable très facile à obtenir. On s'appuie d'ailleurs sur d'extrêmement nombreuses moyennes, et non sur quelques observations presque isolées.

Le point essentiel que je veux essayer de démontrer est le suivant :

Un organisme, s'il a vécu dans un milieu A, pousse plus facilement sur ce milieu A que le même organisme, de même origine, qui a vécu sur un milieu différent de A. Donc il s'est accoutumé au milieu A, et il a transmis son accoutumance à toute sa descendance.

Pour résoudre cette question, je me suis adressé au ferment lactique, que depuis longtemps je considère comme le *test* de choix pour les expériences de ce genre.

I. — TECHNIQUE

La technique employée pour faire cette mesure de l'acidité est des plus simples : du lait de vache, additionné de son volume d'eau distillée et de quelques gouttes de phtaléine, est neutralisé par addition de quelques gouttes de potasse caustique, juste assez pour qu'une coloration à peine rosée apparaisse, si faible encore qu'on n'est pas sûr que la liqueur soit colorée. Il ne convient pas d'ajouter plus de potasse, non parce que cela modifie quelque chose à la fermentation du lait, mais parce qu'alors la stérilisation à 110° caramélise quelque peu le lait, et rend moins facile la perception des colorations acidimétriques.

Le liquide lacté est alors réparti dans des tubes en U, à la dose exactement mesurée de 10 cent. cub. Des appareils de mesure précise permettent de faire exactement et rapidement cette répartition. Tous les tubes sont recouverts d'un tampon d'ouate et mis à l'autoclave pour stérilisation, à la température de 110° pendant trois minutes.

Au cas où l'on veut que ce lait soit additionné d'une substance toxique quelconque, à la dose, par exemple, de A, par litre, au lieu d'eau distillée, on emploie la solution de ce sel à 2A par litre, ce qui fait que le lait contient A de la substance toxique.

Pour avoir $\frac{A}{2}$, on mélange volumes égaux de la solution de lait contenant A avec le lait dilué normal; en mélangeant la solution lactée de $\frac{A}{2}$ avec du lait normal, on a $\frac{A}{4}$, et ainsi de suite. Ce qui permet d'avoir des liqueurs parfaitement comparables ne différant entre elles que par les quantités $A, \frac{A}{2}, \frac{A}{4}$ de la substance toxique que l'on veut étudier.

Ces tubes étant ainsi préparés, on ensemence par les procédés habituels les tubes contenant le lait normal N avec le ferment lactique, et, le même jour, on ensemence aussi un des tubes

contenant A. Donc on a un ferment ayant poussé sur du lait normal (N) et un ferment ayant poussé sur du lait toxique (A).

On recommence le lendemain la même opération. Seulement, pour semence, on prend, d'une part, le ferment qui a poussé sur N et, d'autre part, le ferment qui a poussé sur A. Les jours suivants on fait de même, de sorte qu'au bout de quelques jours on a deux variétés de ferment, l'une qui, par ensemencements successifs a poussé de N, en N, en N, l'autre qui, par ensemencements successifs, a poussé de A, en A, en A. Il s'agit de comparer l'activité de ces deux variétés.

La principale précaution à prendre est de rendre la fermentation bien homogène, pour éliminer toute influence perturbatrice : la température par exemple, ou la différence de forme des tubes. A cet effet, les tubes en U qui servent à la fermentation ne sont pas placés seulement dans l'étuve à l'air libre, mais encore dans un récipient plein d'eau, placé lui-même dans l'étuve. Dans ces conditions, la température des divers tubes est absolument identique.

Pour le dosage de l'acidité, il se fait par une solution de potasse à $\frac{2}{1000}$. Mais comme, avec la phtaléine, l'indice colorimétrique varie notablement avec la quantité de phtaléine employée, on ajoute à la solution potassique une assez forte quantité de phtaléine, et on s'arrête dans le titrage quand une coloration nettement rosée apparaît.

Le plus souvent, on faisait deux titrations : la première après 16 heures, la seconde après 22 heures de fermentation, ce qui nécessite, bien entendu, deux tubes différents. C'est la somme de ces deux quantités, celle de 16 et celle de 22 heures, qui était comparée à la somme des deux quantités, de 16 et de 22 heures aussi, pour le ferment normal et le ferment ayant poussé sur A.

Quant à l'ensemencement, il se faisait d'après les procédés classiques, au moyen d'un fil de platine, stérilisé, puis plongé dans la solution où était la semence. Dans certains cas, quand il était nécessaire d'introduire exactement la même quantité de ferment (ce qui est parfois difficile avec le fil de platine), je procédais autrement. J'introduisais quelques gouttes d'un petit-lait ayant fermenté (par un ferment lactique pur) dans un litre d'eau distillée stérilisée. Cette eau, convenablement agitée,

était versée, à la dose de 1 cent. cube, ou de $1/2$ cent. cube, dans les flacons où devait s'opérer la fermentation.

Telles sont les conditions techniques pour le dosage de l'acidité et la préparation du lait à fermenter. Quelques précautions spéciales sont à prendre pour le dosage, quand la liqueur est elle-même acide, comme cela est le cas pour le sulfate de cadmium, par exemple, ou le phosphate acide de potassium, ou l'arséniate de potassium. Pour ces deux sels, on remarque que la liqueur est très alcaline au tournesol, alors qu'à la phtaléine elle réagit comme un acide. Dans ces cas, je neutralisais la liqueur mère, additionnée de phtaléine, par de la potasse jusqu'à ce qu'apparût une teinte à peine rosée. Il s'ensuit que toute modification de l'acidité de cette liqueur mère neutralisée, mélangée au lait neutralisé, est bien due à la formation de telle ou telle quantité de sel lactique.

Mais je ne procédais pas ainsi dans tous les cas. Et si, pour une raison ou pour une autre, le lait, additionné de la substance saline, réagissait encore à la phtaléine comme un acide, on dosait cette acidité avant la fermentation. Et cette quantité d'acide préformé était, dans les calculs, retranchée de la quantité d'acide trouvée après fermentation, la différence donnant évidemment la réelle quantité d'acide lactique produit par le ferment.

Cela posé, il s'agit maintenant de savoir comment les calculs peuvent être faits.

Evidemment, ce qui importe dans ce cas, c'est moins la quantité absolue d'acide lactique formée que la comparaison entre l'activité des deux ferments : le ferment N et le ferment A, lorsque tous les deux poussent dans des milieux identiques.

Soit alors, je suppose, une série de tubes contenant 0.00 ; $\frac{A}{2}$, A, et $2A$ de substance toxique. J'ensemence ces divers tubes avec N. Soit une autre série tout à fait comparable de tubes contenant 0.00 , $\frac{A}{2}$, A et $2A$ de la même substance; je les ensemence pareillement tous avec le ferment A. Ce qu'il faut comparer, dans ce cas, c'est le ferment N ayant poussé sur 0.00 et le ferment A ayant poussé sur 0.00 ; le ferment N ayant poussé sur A et le ferment A ayant poussé sur A, etc.

Supposons alors, pour prendre un exemple réel, que dans un cas [ensemencement avec le ferment lactique ayant poussé sur du lait normal (N) et ce même ferment ayant poussé sur du lait additionné de 0.9 par litre de bromure de potassium (A)] nous ayons, après 24 heures de fermentation, les chiffres suivants :

Ensemencement par N.

	EN KBr	QUANTITÉ DE KOH pour neutralisation.
N	0.0	8 »
$\frac{A}{2}$	0.45 p. 1000	4.8
A	0.90 p. 1000	5.1
2A	1.8 p. 1000	3.5

Ces chiffres, pris en soi, n'ont aucun autre intérêt que de prouver que le ferment pousse d'autant moins bien que la quantité de bromure de potassium dans le lait est plus grande. Mais ils prennent tout leur intérêt, ces chiffres, lorsque je les compare à ce que donne le même ferment qui a poussé depuis quelques jours sur A.

Alors nous avons pour le ferment A les chiffres suivants :

	EN KBr	QUANTITÉ DE KOH pour neutralisation.
N	0.0	6.6
$\frac{A}{2}$	0.45 p. 1000	7.5
A	0.90 p. 1000	7.8
2A	1.8 p. 1000	3.7

Alors, pour les comparer, je supposerai que dans tous les cas la quantité d'acide lactique formée par l'ensemencement du ferment N a été égale à 100. La quantité formée par l'ensemencement du ferment A sera dans ce cas :

	EN KBr	RAPPORT D'ACTIVITÉ
N	0.0	83
$\frac{A}{2}$	0.45 p. 1000	156
A	0.90 p. 1000	154
2A	1.8 p. 1000	106

Cela veut dire que, si le ferment N a donné dans N une quantité égale à 100, le ferment A, ensemencé dans N, n'aura donné que 88 et, par conséquent, aura moins bien poussé. D'autre

part, si le ferment N, ensemencé dans $\frac{A}{2}$, a donné 100, le ferment A, ensemencé dans $\frac{A}{2}$, aura donné 136 ; par conséquent il aura mieux poussé que le ferment N dans le liquide.

J'appelle, pour simplifier, *rapport d'activité*, ce chiffre qui compare la croissance du ferment A à la croissance du ferment N dans le même milieu.

C'est ce chiffre que vont déterminer les nombreuses expériences qui suivent. On voit tout de suite que, plus le rapport est élevé, plus le ferment A, c'est-à-dire ayant poussé sur un lait toxique, l'emporte en activité sur le ferment N, c'est-à-dire un ferment ayant poussé sur un lait normal.

II. — RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES

Jusqu'à présent, on n'avait pu encore donner ce chiffre indiquant numériquement les degrés de l'accoutumance du ferment aux milieux toxiques dans lesquels on le contraint à vivre. De là, semble-t-il, le grand intérêt de donner à cette loi générale, quelques constantes numériques.

1° Séléniate de potassium (1).

On commence par établir la dose toxique de séléniate de potassium et son influence sur le développement du ferment lactique.

SÉLÉNIATE DE K en gr. par litre.		
Exp. I.	—	
	0.0	100
	2.5	101
	5.0	102
	7.5	74
Exp. II.	0.0	100
	2.5	65
	5.0	66
	7.5	62
Moyenne. . .	0.0	100
	2.5	83
	5.0	84
	7.5	68

(1) Les quantités indiquées se rapportent toujours à des grammes par litre de liquide.

Le 3^e jour on prend comme semence le ferment qui a poussé sur 5 (1) : et par comparaison avec le ferment normal on a les trois séries suivantes :

	0.00	2.5	5	7.5
SÉRIE 1.	—	—	—	—
Troisième jour	72	78	146	77
Quatrième jour	89	117	124	142
Cinquième jour	128	78	126	156
Moyenne	96	98	132	125

Le 6^e jour on enseme avec le ferment qui a poussé sur 7.5 et on a :

	0.00	5	7.5	10
SÉRIE 2.	—	—	—	—
Sixième jour	94	106	126	56
Septième jour	77	116	117	214
Huitième jour	96	111	151	188
Moyenne	89	111	138	153

Alors on enseme avec le ferment qui a poussé sur 10 et on a :

	0.00	7.5	10	20
SÉRIE 3.	—	—	—	—
Neuvième jour	73	82	158	168
Dixième jour	82	100	180	115
Onzième jour	90	102	128	240
Douzième jour	110	150	124	235
Moyenne	89	108	148	189

On enseme avec le ferment qui a poussé sur 20 et on a :

	0.00	10	20	43
SÉRIE 4.	—	—	—	—
Treizième jour	111	122	152	148
Quatorzième jour	89	118	150	250
Quinzième jour	96	103	137	194
Seizième jour	91	144	166	246
Dix-septième jour	69	104	140	242
Moyenne	91	118	149	222

On enseme avec le ferment qui a poussé sur 43 et on a :

	0.00	20	43	65
SÉRIE 5.	—	—	—	—
Dix-huitième jour	75	92	105	93
Dix-neuvième jour	77	131	123	131
Vingtième jour	82	122	145	176
Moyenne	78	115	124	133

(1) Pour simplifier, nous dirons dans le cours de ce travail : ferment à 2 ou à 4, ou à 5, selon qu'il a poussé sur des liqueurs contenant 2, 4, ou 5 grammes par litre de la substance toxique spécialement étudiée.

De cette expérience on peut déduire diverses conclusions :

1° D'abord, quelle que soit la concentration, en séléniat de potassium, de la liqueur où a végété le ferment, quand il a végété sur du lait normal, il a à peu près toujours la même activité par rapport au ferment normal. Elle a été en effet :

Ferment ayant végété sur.	{	5	96
		7.5	89
		10	89
		20	91
		43	78
Moyenne générale.			85

Toutefois, il semble que le ferment sélénié soit à la longue devenu un peu moins apte à végéter sur le lait normal ; car, si l'on prend la moyenne des groupes de six en six jours, on a :

Groupe 1.	93
Groupe 2.	93
Groupe 3.	81

Mais ce n'est qu'une nuance.

2° Dans toutes les séries il est évident que, plus la quantité de séléniat de potassium est forte, plus, dans ces laits séléniés, le ferment sélénié l'emporte en activité sur le ferment normal.

	0.00	$\frac{A}{2}$	A	2 A
Première série (5).	96	98	132	125
Deuxième série (7.5).	89	111	138	153
Troisième série (10).	89	108	148	189
Quatrième série (20).	91	118	149	222
Cinquième série (43).	78	115	124	133

L'inspection de ces rapports, qui vont en croissant à mesure que la liqueur est plus concentrée en séléniat, montre en toute évidence cette accoutumance du ferment sélénié à des solutions de plus en plus concentrées.

La généralité de ces lois va nous être prouvée par l'étude documentaire d'autres substances anormales, introduites dans le lait.

2° Phosphate de potassium.

Avec le phosphate de potassium il faut, pour faire des dosages par la phénolphtalcine, employer un phosphate de potassium

neutre (tribasique) qui, au tournesol, donne une coloration bleue intense. On l'obtient en saturant le phosphate acide par la potasse, en une liqueur contenant quelques gouttes de phénolphtaléine, et on s'arrête dès qu'une coloration rosée apparaît.

Les premiers dosages ont donné les chiffres suivants :

QUANTITÉ de PO_4K^3 par litre.	MOYENNE de 111 dosages.
0.00	6.0
4.5	6.4
9.0	6.9
18.0	7.3
37.0	2.1

Alors le 4^e jour on ensemence avec le ferment contenant 18 de phosphate de potassium, et on continue pendant longtemps.

Voici la série successive des rapports d'activité :

	0.00	4.5	9	18	37	75
1.	160	35	102	3	65	0.0
2.	100	51	62	88	100	0.0
3.	66	58	71	93	413	770
4.	102	100	100	129	276	443
5.	107	96	101	137	265	329
6.	100	111	117	130	271	344
7.	106	97	57	67	125	433
8.	97	100	103	106	142	325
9.	93	72	115	100	148	0.0
10.	102	107	107	113	137	200
11.	93	159	152	395	180	0.0
12.	93	108	125	192	205	237
13.	104	135	180	210	255	190
14.	99	104	116	171	175	162
15.	101	106	124	160	167	116
16.	93	102	136	155	290	?
17.	84	110	136	165	150	182
18.	100	105	122	157	215	150
19.	95	117	132	159	125	205
20.	100	140	115	158	167	150
21.	88	84	106	137	395	280
22.	95	92	102	113	214	395
23.	96	100	122	126	188	175
24.	70	85	73	164	134	180
25.	75	84	150	144	370	162
26.	59	87	220	650	190	?
27.	62	103	145	178	205	208

De cette première longue série peuvent déjà se constater divers faits importants.

D'abord, pour les liqueurs contenant 18 grammes, c'est-à-dire identiques à la concentration de la liqueur dans laquelle le ferment a poussé, il s'est fait dans les premiers cinq jours une vraie accoutumance, et le rapport d'activité a été en croissant très régulièrement.

3 88 93 129 137

Ensuite il y a eu quelques irrégularités, facilement explicables par ce fait que ces rapports multiplient énormément les divisions trouvées par le titrage acide.

Mais on retrouve cette progression de l'accoutumance en prenant, pour ces vingt-sept jours, la moyenne de neuf jours.

Premier groupe, de 9 jours	83
Deuxième groupe, de 9 jours	191
Troisième groupe, de 9 jours	224

Ainsi l'accoutumance s'est établie de plus en plus avec le temps, et même au bout de dix-huit jours, elle n'était pas encore maximale.

Nous allons retrouver la même loi, mais en sens inverse, pour les liqueurs témoins; c'est-à-dire que le ferment phosphaté, habitué de plus en plus au phosphate, pousse, relativement au ferment normal, de moins en moins bien sur du lait normal.

Premier groupe, de 9 jours.	97
Deuxième groupe, de 9 jours.	96
Troisième groupe, de 9 jours.	82

Pour les autres concentrations on a, en prenant des groupements de 9 en 9, les moyennes suivantes :

	0.00	4.5	9	18	37
Premier groupe . .	97	80	92	83	201
Deuxième groupe .	96	115	133	191	197
Troisième groupe .	82	99	129	224	221

Ainsi est rendue manifeste l'augmentation avec le temps de l'accoutumance, mais surtout pour les laits phosphatés à 18 grammes, c'est-à-dire pour la concentration à laquelle ont été habitués les ferments servant de semence.

Nous n'avons pas pris les laitsensemencés sur du phosphate de potasse très concentré (75 p. 1.000), car alors ils ne poussent pas toujours. Quelquefois le ferment normal n'y pousse pas; quelquefois ni le ferment normal, ni le ferment phosphaté n'y peuvent pousser.

En ne tenant pas compte des cas où le ferment n'a pas poussé, on trouve les chiffres suivants :

Premier groupe.	440
Deuxième groupe.	177
Troisième groupe	219

Si l'on élimine le chiffre évidemment trop fort du 1^{er} groupe, on voit bien qu'à partir d'une certaine concentration l'accoutumance n'augmente plus, et même qu'elle diminue, comme si le ferment phosphaté, déjà quelque peu modifié, n'avait pas assez de vitalité pour prospérer sur des liqueurs très fortement phosphatées.

Il est bon de comparer ces progressions à celles que donne le séléniate de potassium. Soit A la concentration de la liqueur d'ensemencement : appelons $\frac{A}{2}$ le lait à 9 de phosphate; A, le lait à 18; 2 A, le lait avec 37, on a :

	0.00	$\frac{A}{2}$	A	2 A
Séléniate de potassium.	85	115	138	164
Phosphate de potassium.	89	118	199	206

Enfin, dans un grand nombre d'expériences on trouve, comme dans la moyenne générale, des progressions vraiment typiques :

	0.00	4.5	9	18	37	75
3 ^e jour	66	58	71	93	413	770
4	102	100	100	129	276	443
6	100	111	117	130	271	344
8	97	100	103	106	142	325
10	102	107	107	113	137	200
12	93	108	125	192	205	237
18	100	105	122	157	215	150
21	88	84	106	137	395	280
22	95	92	102	113	214	395
25	75	84	150	144	370	162

En présence de ces chiffres on doit être convaincu que le ferment phosphaté s'accoutume au phosphate de potassium.

L'expérience a été poussée plus loin, et pendant assez longtemps encore on a suivi les variations du rapport d'activité avec un ferment ayant poussé sur du lait additionné de 37 grammes de phosphate de potassium.

0.00	4.5	9	18	37	75
78	97	99	105	216	200
82	93	109	134	94	120
100	84	100	400	350	?
93	146	150	141	355	400
91	154	136	200	180	182
94	116	122	143	154	134
63	93	108	151	180	?
Moyenne. 86	112	118	182	217	?

Ici encore, nous voyons très nettement l'accoutumance, d'autant plus évidente que la solution est plus concentrée.

3° Nitrate de potassium.

Les premières expériences ont eu pour objet de déterminer les doses d'azotate de potassium qui agissent sur le ferment sain par litre : 62 gr. ; 31 gr. ; 7 gr. 5 ; etc. ; on a :

0.00	100
0,11	95
0,22	61
0,43	31
3,8.	35
7,5.	29
31,0.	24

Alors on fait (au 3^e jour), pendant un mois (31 jours), des ensemencements avec du ferment ayant poussé sur du lait nitraté ; et on obtient les chiffres suivants :

PREMIÈRE SÉRIE. — Ensemencement pur de ferment ayant poussé sur 0.11.

	0.00	0.11	0.22	0.43
1.	75	96	137	147
2.	63	96	126	89
3.	77	87	122	130
4.	71	94	164	125
5.	78	93	205	142
Moyenne. .	73	93	151	127

DEUXIÈME SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 0.22.*

	0.00	1.75	3.85	7.50
	—	—	—	—
6.	64	86	137	111
7.	58	72	120	138
8.	61	84	116	120
9.	75	94	162	172
10.	67	83	144	300
Moyenne. .	65	84	136	173

TROISIÈME SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 0.43.*

	0.00	0.22	0.43	0.85
	—	—	—	—
11.	83	110	160	112
12.	82	110	144	205
13.	86	131	160	202
14.	82	154	180	315
Moyenne. .	84	126	161	208

QUATRIÈME SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 0.85*

	0.00	0.43	0.85	1.75
	—	—	—	—
15.	60	85	124	148
16.	88	122	167	165
17.	81	122	167	205
18.	71	100	154	290
Moyenne. .	75	107	153	202

CINQUIÈME SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 1.75.*

	0.00	0.85	1.75	3.85
	—	—	—	—
19.	76	88	118	134
20.	79	102	128	156
21.	84	111	122	150
22.	72	112	140	210
23.	59	79	102	190
Moyenne. .	74	98	122	166

SIXIÈME SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 3.85.*

	0.00	1.75	3.85	7.50
	—	—	—	—
24.	67	96	105	116
25.	58	75	82	127
26.	62	114	126	129
27.	75	125	173	196
28.	76	114	154	310
Moyenne. .	68	105	128	175

SEPTIÈME SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 7.5*

	0.00	3.85	7.5	15
29.	75	89	112	172
30.	84	111	150	212
Moyenne. .	80	100	131	192

HUITIÈME SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 15.*

	0.00	7.5	15	31
31.	85	101	135	217

NEUVIÈME SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 31.*

	0.00	15	31	62
32.	81	86	140	164
33.	64	81	107	211
Moyenne. .	73	84	123	187

On remarquera tout d'abord l'extrême homogénéité de ces chiffres. Pour toutes les séries, et même pour les chiffres de chaque série, il y a, presque sans exception, une accoutumance d'autant plus manifeste que la solution est plus riche en nitrate de potassium.

La moyenne générale, si on suppose l'ensemencement fait par A, donnera pour l'ensemble des séries :

	0.00	$\frac{A}{2}$	A	2 A
Première série. .	73	93	151	127
Deuxième série. .	65	84	136	173
Troisième série. .	84	126	161	208
Quatrième série. .	75	107	153	202
Cinquième série. .	74	98	122	166
Sixième série. . .	68	105	128	175
Septième série. .	80	100	131	192
Huitième série. .	85	101	135	217
Neuvième série. .	73	84	123	187
Moyenne. .	75	100	138	183

Ce qui concorde d'une manière tout à fait satisfaisante avec les chiffres précédents, à savoir :

Séléniate de potassium. .	85	115	138	164
Phosphate de potassium. .	89	118	199	206

Plus encore avec le nitrate de potassium qu'avec le séléniate de potassium et le phosphate de potassium, le ferment s'est habitué à vivre sur des solutions nitratées, de manière à mal végéter sur du lait normal. Ainsi, le ferment normal sur du lait normal donnant 100, le ferment nitraté, poussant sur du lait normal, ne donne plus que 75. Parfois même, par exemple, pour la 2^e série, le rapport d'activité n'est plus que de 65, en moyenne. Presque jamais, avec le phosphate de potassium, on n'est descendu aussi bas.

4^o Sulfate de cuivre (1).

Le 3^e jour, après que le ferment a poussé sur 12 de SO^4Cu , on prend le ferment qui a poussé sur 3 de SO^4Cu , et on trouve :

	0.00	3	6	12
1.	78	106	120	108
2.	107	130	84	100
3.	79	96	69	49
4.	102	122	100	84
5.	112	125	81	112
6.	75	108	112	94
7.	106	99	99	79
8.	105	114	174	67
9.	106	109	168	70
10.	106	130	320	78

En faisant deux groupes de 5 on a :

	0.00	3	6	12
Premier groupe.	96	116	91	91
Deuxième groupe.	101	112	175	78
Moyenne générale. . .	98	114	133	85

On remarquera combien, en réalité, il y a eu une nette accoutumance pour la solution à 6 de SO^4Cu . Dans les cinq premiers jours, et même jusqu'au septième inclusivement, le ferment a très mal poussé. Mais à partir du 8^e jour, il a donné des chiffres très forts et croissants, comme si alors, presque soudainement, il s'était habitué au cuivre.

D'autre part, poussant sur du lait très riche en cuivre (12), au lieu de s'habituer, il pousse mal; plus mal même que le ferment normal, comme si, déjà un peu malade, il ne pouvait

(1) Les doses de sulfate de cuivre sont données non plus en grammes, mais en milligrammes par litre.

plus supporter aussi bien que le ferment normal une liqueur très cuivrique.

Mais peu à peu il s'habitue à des liqueurs très cuivriques, comme on le verra par la suite.

DEUXIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par ferment sur 6.*

	0.00	3	6	12
11.	105	134	158	149
12.	104	100	150	140
13.	110	162	168	136
14.	109	135	206	110
15.	107	118	158	340
16.	111	116	141	205
Moyenne. .	106	129	163	180

TROISIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par ferment sur 12.*

	0.00	6	12	25
17.	101	111	124	120
18.	93	125	109	111
19.	107	109	93	109
20.	116	83	114	120
21.	128	98	117	119
22.	121	102	118	135
Moyenne. .	110	105	112	117

QUATRIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par ferment sur 25.*

	0.00	12	25	50
23.	104	94	111	134
24.	107	136	136	118
25.	130	129	180	180
26.	106	110	131	73
27.	108	100	106	94
28.	106	125	162	100
29.	98	116	117	119
30.	78	96	71	60
31.	102	123	100	97
Moyenne. .	104	114	124	108

CINQUIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par ferment sur 50.*

	0.00	25	50	75
32.	114	126	82	113
33.	82	109	114	95
34.	105	105	83	103
35.	106	128	155	76
36.	106	120	168	130
37.	104	121	129	176
38.	105	119	129	209
39.	103	117	125	181
Moyenne. .	103	118	132	135

SIXIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par ferment sur 75.*

	0.00	50	75	152
40.	106	125	127	59
41.	76	83	81	70
42.	101	119	100	112
43.	108	102	107	166
44.	111	119	200	88
45.	110	128	152	255
46.	104	105	146	88
47.	105	107	130	159
48.	114	129	162	162
49.	108	115	152	247
Moyenne. .	104	113	140	140

En divisant en deux groupes, on a :

Premier groupe.	102	109	140	100
Deuxième groupe.	107	117	140	181

On remarquera ici que, contrairement à ce qui s'est passé pour la 1^{re} série, l'accoutumance à la solution cuivrique forte s'est faite assez difficilement.

SEPTIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par ferment sur 125.*

	0.00	75	125	520
50.	102	124	136	172
51.	103	118	112	104
52.	100	110	87	98
53.	116	88	109	109
54.	104	126	122	123
Moyenne. .	108	112	113	121

HUITIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par ferment sur 250.*

	0.00	125	250	500
55.	112	225	200	226
56.	107	119	168	117
57.	134	100	132	103
58.	106	127	173	200
59.	116	100	125	134
60.	110	131	140	385
61.	111	117	124	302
62.	104	92	104	121
63.	105	110	132	106
64.	106	116	116	250
Moyenne. .	112	124	141	195

NEUVIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par ferment sur 500.*

	0.00	250	500	700
65.	100	100	124	118
66.	104	100	151	140
67.	107	117	140	154
68.	107	124	150	106
Moyenne. .	104	110	141	129

DIXIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par ferment sur 750.*

	0.00	500	750	1.000
69.	101	103	103	87
70.	104	96	111	132
71.	103	276	196	232
72.	76	224	225	255
Moyenne. .	96	175	159	176

En réunissant ces diverses séries, on a les chiffres suivants :

	0.00	$\frac{A}{2}$	A	2 A
98	114	133	85	
106	129	163	180	
110	115	112	117	
104	114	124	108	
103	118	132	135	
104	113	140	140	
108	112	113	121	
112	124	141	195	
104	110	141	129	
96	175	159	176	
Moyenne générale.	104	122	136	138

L'accoutumance est donc très nette pour le sulfate de cuivre, puisque cette moyenne générale, bien homogène en somme, résulte d'un nombre considérable d'expériences.

On remarquera que le ferment ayant vécu sur du lait cuivrique donne presque toujours sur du lait normal des quantités d'acide lactique plus fortes que le ferment ayant vécu sur du lait normal. C'est le contraire de ce que nous avons vu pour les laits contenant du séléniate ou du phosphate de potassium.

On remarquera aussi qu'entre A et 2A de concentration la différence est presque nulle.

Enfin l'accoutumance ne paraît guère augmenter avec le temps. Il est vrai qu'on fait croître la concentration de la solu-

tion sur laquelle pousse le lait, de sorte qu'il est difficile de savoir quelle est la part de l'accoutumance même, ou de la concentration croissante de la solution. L'identité presque absolue entre les chiffres des cinq premières séries et les chiffres des cinq dernières semblerait prouver qu'à partir du huitième ou dixième jour l'accoutumance s'est établie, et qu'elle ne va plus s'accroître.

5° Chlorure de sodium.

Les doses de chlorure de sodium doivent être très fortes pour que quelque différence se manifeste dans le croît du ferment. Les chiffres indiqués ici se rapportent toujours, en grammes, à un litre de liquide.

Voici d'abord quelques chiffres se référant à un autre liquide que le lait employé précédemment : j'opérais sur une solution de petit-lait presque neutralisé. Les expériences sont peu nombreuses.

Ensemencement par ferment ayant poussé sur 150 grammes de NaCl.

	0.00	150	200
	93	82	124
	107	101	124
	103	134	94
	94	141	118
Moyenne.	99	114	115

Elles semblent montrer une certaine accoutumance croissante; et d'ailleurs, ce qui les rend intéressantes, c'est que le dosage dans la solution de lactose peut se faire avec une grande précision.

Ensemencement par le ferment ayant poussé sur 150.

	0.00	150	200	250
1.	93	104	106	104
2.	104	130	124	330
3.	122	136	128	114
4.	145	151	158	150
5.	120	130	140	124
6.	127	135	129	136
7.	89	89	77	136
Moyenne .	114	125	123	156

Ensemencement par le ferment ayant poussé sur 75.

	0.00	75	150	250
8.	105	103	144	171
9.	116	109	150	135
Moyenne .	110	107	147	153

Ensemencement par le ferment ayant poussé sur 150.

	0.00	75	150	250
10.	123	(148)	158	(155)
11.	(156)	111	121	132
12.	91	127	76	100
13.	103	103	91	98
14.	87	81	133	137
15.	93	92	77	112
16.	105	102	101	130
17.	77	77	67	120
18.	95	111	146	98
19.	96	110	(195)	118
Moyenne .	103	106	116	120

En comparant cette troisième série, on voit qu'il n'y a pas de progrès dans l'accoutumance. Au contraire, les rapports sont notablement moins réguliers; car, si de la troisième série on retranche le chiffre le plus fort, celui que nous mettons entre parenthèses, on aurait une moyenne assez différente.

Moyenne .	78	101	107	116
-----------	----	-----	-----	-----

Tout de même, même après cette élimination, il n'en reste pas moins établi qu'avec NaCl il y a accoutumance, mais que par le temps elle ne semble pas s'accroître.

La moyenne d'ensemble pour l'accoutumance du ferment au NaCl nous donne :

0.00	107
$\frac{A}{2}$	111
A	120
2 A	138

6° Bromure de potassium.

Avec le bromure de potassium les expériences ont été très nombreuses. Je donnerai d'abord la première série de ces

expériences; on verra qu'elles sont à peu près identiques aux secondes qui les contrôlent.

PREMIÈRE SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 0.45 p. 1000.*

	0.00	0.22	0.45	0.90
1.	98	106	107	100
2.	92	98	103	91
3.	93	102	107	143
4.	76	92	125	110
5.	76	91	107	116
6.	87	93	114	138
Moyenne.	87	98	110	116

DEUXIÈME SÉRIE. — *Ferment ayant poussé sur 0.9 p. 1000.*

	0.00	0.22	0.45	0.90	1.8
7.	77	93	107	124	2
8.	85	94	105	178	2
9.	83	?	156	156	106
10.	83	?	103	125	115
11.	89	?	104	105	119
12.	94	?	105	127	154
Moyenne.	85	96	113	136	123

TROISIÈME SÉRIE. — *Ensemencement avec 1.8 p. 1000.*

	0.0	0.9	1.8	3.7
13.	67	86	112	89
14.	91	105	125	128
15.	69	106	126	128
16.	94	104	122	160
Moyenne.	80	100	121	126

QUATRIÈME SÉRIE. — *Ensemencement avec 3.7 p. 1000.*

	0.0	1.8	3.7	7.5
17.	82	107	108	124
18.	92	108	106	108
19.	72	105	122	170
20.	61	126	143	225
Moyenne.	77	112	120	157

CINQUIÈME SÉRIE. — *Ensemencement avec 7.5 p. 1000.*

	0.0	3.7	7.5	15
21.	90	107	132	144
22.	73	136	153	210
23.	59	117	114	174
24.	72	132	150	225
Moyenne.	74	123	137	188

SIXIÈME SÉRIE. — *Ensemencement avec 15 p. 1000.*

	0.00	7.5	15	30
	—	—	—	—
25.	69	122	140	208
26.	77	143	138	150
27.	73	127	156	216
28.	65	146	178	215
Moyenne. .	71	127	153	197

Ainsi, pour ces six premières séries, on voit avec une netteté éclatante que le ferment s'est successivement habitué à vivre sur des milieux de plus en plus riches en bromure de potassium.

Nous avons, en effet :

		0.00	$\frac{A}{2}$	A	2 A
		—	—	—	—
A = 0.45	Première série . . .	87	98	110	116
A = 0.90	Deuxième série . . .	85	96	113	136
A = 1.85	Troisième série. . .	80	100	121	126
A = 3.7	Quatrième série. . .	77	112	120	137
A = 7.5	Cinquième série . . .	74	123	137	188
A = 15.0	Sixième série	71	127	153	197
	Moyenne. . .	79	108	126	153

Et cette accoutumance se traduit par deux phénomènes connexes, qui ont autant de valeur l'un que l'autre pour prouver l'accoutumance, à savoir : d'une part, que le ferment qui a poussé sur bromure de potassium pousse (relativement au témoin) de moins en moins bien sur le lait normal; d'autre part, que le même ferment qui a poussé sur bromure de potassium pousse (relativement au témoin) de mieux en mieux sur du lait normal.

Il n'est pas probable que cette accoutumance croissante dans les séries soit due uniquement à ce que la solution dans laquelle végète le ferment qui ensemence est de plus en plus concentrée. Car, dans une même série, toutes conditions égales d'ailleurs, on voit bien que dans les derniers jours le rapport est plus fort que dans les premiers.

Soient les moyennes que nous avons données, égales à 100; on a dans chaque série, pour les tubes des premiers jours et les tubes des seconds jours, les moyennes suivantes :

1° Pour les premiers jours :

	0.00	$\frac{A}{2}$	A	A
Première série. . .	108	103	96	96
Deuxième série. . .	97	?	108	97
Troisième série. . .	99	85	108	85
Quatrième série. . .	113	95	89	72
Cinquième série. . .	110	99	104	94
Sixième série. . .	103	93	91	92
Moyenne. . .	104	95	98	91

2° Evidemment, les chiffres des seconds jours sont complémentaires, de sorte qu'on aurait pour eux :

96	105	102	109
----	-----	-----	-----

Ces chiffres montrent bien que, d'une part, avec le temps, les ferments habitués au bromure de potassium finissent par pousser moins bien que les ferments normaux dans le lait normal; d'autre part, que ces ferments habitués finissent par pousser mieux que le ferment normal dans le lait contenant du bromure de potassium.

Mais ce ne sont, à vrai dire, que des nuances, et on peut dire que dès le deuxième ou troisième jour l'accoutumance s'est manifestée nettement, encore qu'elle ne soit pas aussi complète qu'elle sera plus tard.

7° Arséniate de potassium.

C'est avec l'arséniate de potassium que les expériences ont été le plus nombreuses. Il s'est trouvé, en effet, que c'est surtout avec l'arséniate de potassium que l'accoutumance s'établit. On sait depuis longtemps d'ailleurs que les arsénates, si toxiques pour les animaux (qui ont un système nerveux), sont à peu près inoffensifs pour les ferments et levures végétales. Dans des solutions aqueuses contenant 5 p. 100 d'arséniate de bromure de potassium, les champignons et les moisissures poussent en grande abondance.

Afin de ne pas multiplier les chiffres, je ne donnerai que mes dernières expériences.

On commence par ensemercer avec du ferment normal des liqueurs contenant des quantités variables d'arsenic, et on a,

déduction faite de l'acidité primitive (car l'arséniate de potassium n'avait pas été complètement neutralisé) :

QUANTITÉ D'ARSÉNIATE DE POTASSIUM par litre.	ACIDITÉ EN CC. DE KOH
0.0	6.7
—	—
1.5.	5.1
3.1.	4.5
6.2.	1.9
12.5.	1.2

Cela fait, on ensemence par du ferment normal N, et d'autre part par du ferment ayant poussé sur 1.5; et trois jours après par du ferment ayant poussé sur 3.1.

On a alors les suivants rapports d'activité :

0.00	1.5	3.1	6.2	1.25
—	$\left(\frac{A}{2}\right)$	(A)	(2 A)	(4 A)
—	—	—	—	—
93	83	123	250	188
82	96	125	269	250
100	94	104	(285)	230
(112)	130	152	167	163
79	152	147	158	235
84	148	168	175	195
87	127	148	190	205
90	122	138	188	200
92	152	132	154	220
93	160	135	144	270
97	125	133	144	305
82	101	122	150	322
95	107	150	245	(400)
93	(217)	(215)	201	177

Moyenne (en éliminant le chiffre le plus fort de chaque colonne) :

1 ^{er} groupe de 7 .	88	119	138	201	209
2 ^e groupe de 7 .	91	128	130	175	249
Moyenne générale	89	124	134	188	229

De ces chiffres, qui sont en somme très cohérents, on peut en déduire que l'accoutumance n'a pas notablement cru dans le second septénaire.

En prenant comparativement les quatre premiers et les

quatre derniers jours, et toujours en éliminant le chiffre le plus fort, on a, pour les rapports d'activité :

4 premiers jours .	91	101	126	229	208
4 derniers jours. .	92	111	126	185	268

On voit qu'il y a eu quelque accroissement, mais, en somme, assez peu notable, sinon pour les solutions très concentrées.

Il est vrai que le ferment arsenical, même avant ces expériences, avait poussé pendant quatre jours déjà sur des solutions arsenicales, avec quatreensemencements successifs.

Au 24 janvier, c'est-à-dire au quinzième jour, on ensemence avec le ferment qui a poussé sur 6.2; et on a :

0.00	1.5	3.1	6.2	12.5
(127)	156	180	204	127
70	(170)	170	(330)	(741)
48	150	(230)	190	130
70	114	205	250	120
78	109	116	140	190
90	102	130	210	310
88	110	150	190	210
85	102	122	162	300
100	154	168	154	270
73	120	160	178	272
91	134	168	170	265
82	112	154	162	∞
75	89	110	114	235
82	104	109	106	46
30	100	128	135	178

Quoiqu'il y ait quelque incohérence dans ces chiffres, on peut cependant en déduire une moyenne générale (toujours en éliminant le chiffre le plus fort de chaque colonne) et on a alors :

1 ^{er} groupe de 8. .	76	121	153	192	198
2 ^e groupe de 7. .	76	116	142	146	211 (?)
Moyenne générale.	76	119	147	169	204

En comparant les chiffres de cette série (à 6 p. 1.000) aux chiffres de la série précédente (à 3 p. 1.000) on voit que le rapport d'activité n'a pas augmenté; au contraire, qu'il a semblé

diminuer, comme si le ferment arsenical légèrement malade ne pouvait plus aussi facilement végéter dans les liqueurs arsenicales.

Et cela apparaît nettement si on compare le premier groupe de huit jours au second groupe de sept jours. Là, évidemment, il y a une notable diminution.

D'autre part, très nettement aussi, l'accoutumance a augmenté par la plus grande difficulté du ferment arsenical à vivre sur du lait normal. Alors que le rapport d'activité était de 92 dans la première série, il est de 76 dans la seconde.

Ainsi, l'accoutumance du ferment arsenical se manifeste par une bien moindre aptitude (que le ferment normal) à pousser sur du lait normal.

Une troisième série a été poursuivie dans laquelle l'ensemencement était fait par du ferment ayant poussé sur 12.5 d'arséniate de potassium. Les résultats sont assez peu cohérents.

Toutefois, nous croyons les devoir donner :

0.00	1.5	3.1	6.2	12.5	25
—	—	—	—	—	—
85	46	90	100	100	77
58	110	105	100	123	205
86	23	33	47	100	?
96	(135)	(146)	37	100	67
96	87	106	124	205	147
87	100	89	154	212	265
62	67	62	68	94	56
(97)	107	100	140	(350)	(400)
57	67	103	177	110	100
72	88	108	190	170	154
92	100	100	120	109	132
90	121	68	(215)	150	100
Moyenne des 6 premiers jours :					
85	75	85	94	140	?
Moyenne des 6 derniers jours :					
75	91	90	139	126	?
Moyenne générale :					
80	83	87	110	133	130

Ainsi quand on fait pousser le ferment sur une liqueur trop riche en arsenic, loin de s'accoutumer, le ferment devient malade, et pousse, même dans des liqueurs arsenicales, moins bien que le ferment normal. Il y a donc un *optimum* pour l'accoutumance du ferment aux liqueurs arsenicales, et cette

accoutumance semble être aux environs de 5 grammes d'arséniate de potassium par litre, en chiffres ronds.

D'autres expériences, très nombreuses, ont été encore faites par cette même méthode sur l'accoutumance du ferment lactique à l'arsenic; mais je ne les donne pas, car elles ne font que confirmer les résultats qui viennent d'être indiqués ici.

Je retiendrai seulement ceci, c'est que, *dans certains cas*, sans que j'aie pu encore en déterminer les conditions, le ferment arsenical est si bien habitué à l'arsenic qu'il ne pousse plus du tout sur du lait normal, ou du moins avec une très grande lenteur.

La moyenne des rapports a donc été, pour l'arséniate de potassium :

Première série. . . (A = 3.1)	89	124	134	188
Deuxième série. . . (A = 6.2)	76	147	169	204
Troisième série. . . (A = 12.5)	80	87	110	130
Moyenne générale. . .	81	119	133	174

8° Nitrate de thallium.

Le ferment lactique normal est ensemencé sur du lait contenant par litre 0,166 de nitrate de thallium. A cette dose, le nitrate de thallium ralentit notablement la fermentation, comme l'indique l'expérience suivante :

ACIDITÉ (EN CENT. CUBES DE KOH AU MILLIÈME) POUR 10 CENT. CUBES DE LIQUEUR

Témoins.	Lait avec 0 gr. 08 de nitr. de Tl.	Lait avec 0.166 de nitr. de Tl
—	—	—
8.8	4.7	4.0
9.0	4.9	3.9
9.1	5.0	4.1
8.7	4.8	4.1
11.4	6.0	5.3
10.1	6.0	5.3
10.9	6.2	5.0
Moyenne . . . 68.0	37.6	31.7

Soit, en faisant les tubes témoins = 100, on a :

Solution à 0.08	55
Solution à 0.166	47

On détermine alors dans une première série (ensemencement par du ferment à 0.166) le rapport d'activité.

	0.00	$\frac{A}{2}$	A
	0.00	0.08	0.166
Premier jour	83	110	114
Deuxième jour	89	108	109
Troisième jour	(57)	(205)	(190)
Quatrième jour	77	95	99
Cinquième jour	75	107	106
Sixième jour	50	102	101
Septième jour	69	103	112

Moyenne (en éliminant l'exp. 3 qui est aberrante) :

$$0.00 = 78$$

$$\frac{A}{2} = 104$$

$$A = 107$$

DEUXIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par 0.12.*

0.00	0.12	0.25	0.5	1
53	105	45	112	75
50	47	79	52	92
93	65	100	92	83
90	105	95	58	72
77	131	103	125	67
(112)	113	178	225	200
64	128	290	(318)	270
66	(291)	250	188	107
88	184	(375)	255	130
12	57	85	129	(330)
80	91	100	94	36
76	86	103	109	48
74	109	119	113	84

Moyenne (en éliminant le chiffre le plus fort de chaque colonne) :

Les six premiers. 75	94	100	111	98
Les sept derniers 66	109	157	148	112
Moyenne. 70	101	128	129	105

TROISIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par 0.25.*

0.00	0.12	0.25	0.5	1
56	108	81	147	92
58	53	115	107	73
77	104	102	117	?
Moyenne. 70	88	99	124	82

QUATRIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par 0.25.*

	0.00	0.12	0.25	0.5	1
	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
	33	57	130	147	142
	77	98	102	118	138
	102	112	113	108	255
	96	119	136	115	295
Moyenne.	77	96	120	122	207

CINQUIÈME SÉRIE. — *Ensemencement par 1.*

	0.00	0.12	0.25	5	1
	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
	111	113	124	102	189
	78	114	136	123	181
	97	108	127	110	145
	87	104	114	85	174
	108	116	109	128	169
Moyenne.	96	113	122	110	171

La moyenne des rapports d'activité a donc été pour le nitrate de thallium :

	0.00	$\frac{A}{2}$	A	2 A
	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
Première série (A = 0.16)	78	104	107	»
Deuxième série (A = 0.12)	77	»	101	128
Troisième série (A = 0.25)	70	88	99	124
Quatrième série (A = 0.50)	77	120	122	207
Cinquième série (A = 1 »)	96	110	171	»
Moyenne	78	104	120	153

Ainsi, l'accoutumance au nitrate de thallium est très nette, comme aux autres sels. Mais il semble que pour bien voir la différence de croît (sur le lait normal) entre le ferment normal et le ferment habitué au thallium, il soit préférable d'ensemencer avec un ferment qui a poussé sur 0,12, au lieu d'un ferment qui a poussé sur 1.

9° Saccharose.

PREMIÈRE SÉRIE. — *Ensemencement par du ferment ayant poussé sur 6 gr. 25 de saccharose par litre.*

	0.00	3.1	6.25	12.5
	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>
	84	107	128	98
	91	100	125	66
	100	112	111	99
	98	119	130	132
	100	131	117	120
	103	131	133	120
Moyenne.	96	117	124	106

DEUXIÈME SÉRIE. — *Ferment à 12.5.*

0.00	6.2	12.5	25
—	—	—	—
100	110	110	
107	?	127	108
111	143	153	176
104	104	117	151
Moyenne. .	105	119	127
			133

TROISIÈME SÉRIE. — *Ferment à 25.*

0.00	12.5	25	50
—	—	—	—
98	110	99	92
105	111	132	97
110	117	172	139
100	114	136	121
87	110	177	181
82	95	150	166
108	123	174	140
103	111	146	160
105	116	176	188
Moyenne. .	100	112	151
			143

QUATRIÈME SÉRIE. — *Ferment à 50.*

0.00	12.5	25	50	100
—	—	—	—	—
114	134	138	151	
88	114	125	134	
97	»	98	112	83
104	»	113	130	84
97	»	107	124	118
98	»	110	131	162
89	»	123	130	125
97	»	105	119	106
97	»	104	117	103
102	»	96	134	107
77	»	164	181	140

Ici un seul dosage :

103	»	106	124	113
100	»	94	109	107
98	»	105	131	130
104	»	114	117	160
Moyenne.	91	(124)	123	134
				136

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

CINQUIÈME SÉRIE. — Ferment à 75 (un seul dosage).

	0.00	50	75	100
	103	110	117	88
	115	113	148	13
	88	93	124	100
	105	120	140	85
	85	100	138	104
	97	101	168	134
	93	100	104	117
	99	108	117	144
Moyenne. .	98	105	132	110

SIXIÈME SÉRIE. — Ferment à 100 (un seul dosage).

0.00	50	75	100	150	
99	124	111	95	»	
101	99	116	138	»	
101	»	113	124	118	
103	»	120	131	105	
128	»	127	133	103	
Moyenne.	106	111	117	124	109

En reprenant dans leur ensemble ces expériences avec le sucre, on trouve les moyennes suivantes :

	0.00	$\frac{A}{2}$	A	2 A	Moyenne des $\frac{A}{2}$ et 2 A
Première série	96	117	124	106	= 116
Deuxième série	105	119	127	133	= 126
Troisième série	100	112	151	143	= 135
Quatrième série	91	123	134	136	= 131
Cinquième série	98	105	132	110	= 116
Sixième série	106	117	124	109	= 116
Moyenne	99	115	132	123	

Ces expériences, très homogènes, montrent divers phénomènes intéressants, et permettent de fixer en quelque sorte un maximum pour le rapport d'activité.

1° Lorsque le ferment a poussé sur le liquide A, c'est lorsque le ferment est ensemencé dans A, que le rapport d'activité est maximal, plus grand que lorsqu'il est ensemencé sur $\frac{A}{2}$ ou 2A.

2° C'est pour des concentrations moyennes que le rapport

d'activité est maximal (Troisième série) quand le ferment est ensemencé sur une liqueur contenant 25 grammes par litre de saccharose.

3° Il y a certainement une accoutumance, notamment pour la concentration 2A ; car si, dans chaque série, nous prenons les premières mensurations de 2A, nous les trouvons toujours plus faibles que les dernières.

III. — CONCLUSION

Reprenons maintenant ces chiffres dans leur ensemble, et nous pourrons en dégager plus nettement les lois générales.

Soient les concentrations $\frac{A}{2}$, A et 2A, nous aurons pour la vie du ferment A comparée à la vie du ferment N :

	0.00	$\frac{A}{2}$	A	2 A
Séléniate de K . .	85	115	138	164
Phosphate de K . .	89	118	199	206
Azotate de K . .	75	100	138	183
Sulfate de Cu. . .	104	122	136	138
Chlorure de Na. .	107	111	120	138
Bromure de K . .	79	108	126	153
Arséniate de K . .	81	119	138	174
Nitrate de Tl. . .	78	104	120	153
Saccharose . . .	99	115	132	123
Moyenne. . .	88	112	138	159

Cette moyenne, qui résulte d'un nombre considérable de dosages, — plus de 10.000, — prouve en toute évidence l'accoutumance des microbes aux substances toxiques. Il semble donc que le fait soit établi en dehors de toute contestation.

Les substances avec lesquelles il a été expérimenté sont assez diverses et nombreuses, pour que désormais on puisse affirmer qu'une non-accoutumance, si on la rencontre, sera l'exception. Bien entendu, on ne pourra alors parler de non-accoutumance que lorsqu'on aura expérimenté avec des solutions de concentration très différente.

Non seulement l'accoutumance est la loi ; mais encore la diminution d'activité du ferment accoutumé quand on le remet à pousser sur du lait normal. Presque constamment (sauf le cas

du NaCl) il pousse alors moins bien que le ferment normal : cela n'est pas surprenant, puisque aussi bien ce ferment a été altéré par un poison : mais, ce qui est remarquable, c'est que cette diminution de vitalité coïncide avec une vitalité plus grande (par rapport au ferment normal) quand on le fait pousser sur des solutions auxquelles il a été habitué.

Par cette méthode, bien des questions relatives à l'hérédité sont encore à résoudre, sur lesquelles va porter mon attention maintenant(1).

1° A partir de quelle limite l'accoutumance commence-t-elle?

2° Combien de temps persiste-t-elle?

3° Y a-t-il interchange entre les diverses substances toxiques ; et peut-on considérer, au moins dans certains cas, cette accoutumance comme un phénomène osmotique ?

Il est vraisemblable que cette méthode permettra de résoudre ces différentes questions, si importantes dans l'histoire de l'hérédité et de l'adaptation.

(1) Depuis que ce mémoire a été écrit (mars 1914) j'ai fait quelques expériences nouvelles qui seront prochainement publiées.

ESSAIS D'IMMUNISATION DES PETITS RONGEURS CONTRE LES PARATYPHIQUES NATURELLEMENT PATHOGÈNES POUR CES ANIMAUX

par J. DANYSZ et Z. SKRZYŃSKI.

(Laboratoire de Parasitologie agricole de l'Institut Pasteur.)

On connaît aujourd'hui plusieurs races ou variétés de cocco-bacilles appartenant au groupe de paratyphiques ou de *bac. enteritidis* qui sont naturellement pathogènes pour les petits rongeurs.

Ils peuvent infecter ces animaux quand ils sont absorbés avec un liquide ou un aliment quelconque ou bien par simple contact avec les muqueuses buccales ou nasales. Les animaux infectés meurent avec des lésions de la rate, du foie et de l'intestin grêle qui présentent beaucoup d'analogie avec celles de la fièvre typhoïde de l'homme; aussi Loeffler, qui le premier a observé, parmi les souris blanches de son laboratoire, une épidémie due à un de ces microbes, lui a donné le nom de *bacillus typhi murium*. Nous proposons de conserver ce nom pour tous les microbes de ce groupe pathogène pour les petits rongeurs, bien que, d'après les recherches les plus récentes sur leurs propriétés biochimiques et notamment d'après celles de Mühleus, Dahm et Fürst [1] et celles de Hurler [2], il faudrait classer le *bac. typhi murium* de Loeffler parmi les paratyphiques B, et les *bacillus ratti* de Danysz, Dunbar, Issatchenko et Neumann parmi les bacilles de l'entérite de Gaertner.

Il nous semble, en effet, que pour un essai de classification de microbes pathogènes, l'identité des propriétés pathogéniques (comme c'est le cas ici) est tout au moins aussi importante que l'identité des propriétés biochimiques observée *in vitro*.

Par l'ensemble de leurs caractères, ces microbes forment un

groupe bien homogène, et nous proposons de désigner chaque type par une lettre différente.

Toutes nos expériences avaient été faites avec le *bac. typhi murium*, type B, qui a déjà été décrit dans ces *Annales* [3].

VIRULENCE.

Le *bac. typhi murium*, type B, est actuellement pathogène pour toutes les espèces de *Microtinées* (campagnols) et pour un grand nombre d'espèces du genre *Mus* et notamment pour le *M. musculus*, *M. sylvaticus*, *M. decumanus*, *M. rattus*, — mais sa virulence pour toutes ces espèces n'est pas de même degré ni de la même nature. A l'origine, il n'était virulent que pour les campagnols et les souris blanches ou grises, et n'est devenu pathogène pour les rats qu'à la suite d'une adaptation obtenue par des cultures en séries dans des milieux contenant des humeurs de rat plus ou moins modifiées par la digestion [3]. Un procédé analogue a permis à Dujardin-Beaumetz [4] de rendre le microbe de la péripneumonie des bovidés pathogène pour les moutons et les chèvres. L'expérience suivante nous a prouvé, en outre, que la virulence naturelle et la virulence acquise sont dues à des principes différents.

En effet, quand on conserve dans de petites ampoules en verre, scellées à la lampe, un virus qui tuait les souris en 5 à 7 jours et les rats en 5 à 15 jours, et quand on essaie la virulence des cultures obtenues de ces ampoules, d'abord tous les 2 ou 3 mois et ensuite une ou deux fois par an, on constate que, *pour les souris*, la virulence de ces cultures reste d'abord constante et qu'ensuite elle augmente même un peu avec le temps, tandis que, *pour les rats*, la virulence diminue progressivement et se perd complètement au bout de quelques années. Ainsi, nous possédons de ces cultures conservées depuis 1901 qui, au moment de leur mise en ampoules, étaient très virulentes pour les rats et ne tuaient les souris qu'en 5 à 8 jours, et qui, réensemencées et essayées l'année dernière, tuaient toutes les souris en 3 à 4 jours et étaient absolument inoffensives pour les rats. *Il est donc impossible d'admettre que la substance virulente soit la même dans les deux cas.*

Pour les campagnols et les souris, la virulence est, pour

ainsi dire, *une propriété naturelle* que ces microbes conservent aussi longtemps que leur vie. Ceux qui survivent le plus longtemps, qui ont fait preuve par conséquent de plus de vigueur et de résistance, se montrent également les plus virulents. On constate, en effet, en ensemençant le contenu des ampoules sur des milieux solides, que le nombre des microbes qui repoussent et donnent de nouvelles colonies diminue progressivement. Après une conservation de 10 ans à la température de laboratoire, une ampoule de 1 cent. cubeensemencée sur une plaque de gélose ne donnera qu'un petit nombre de colonies isolées qu'il sera facile de compter.

On peut hâter ce processus de sélection en conservant les ampoules à l'étuve, à une température de 36-37 degrés, ou bien en cultivant le microbe dans un milieu plus pauvre en substances nutritives; on peut le prolonger, par contre, en gardant les ampoules à la glacière (1).

La virulence du *bac. typhi murium* pour les rats est, au contraire, *une propriété acquise* qui se transmet par hérédité à travers un grand nombre de générations dans les passages successifs *in vitro*, mais qui s'atténue avec le temps. Le microbe finirait même par la perdre complètement si on ne la lui rendait par un traitement approprié.

Merechkowsky [5], qui a publié sur la culture et la virulence de ce même microbe une série de travaux remarquables, a fait sur ce sujet une expérience des plus démonstratives. Il a fait de très nombreux passages (près de 1.500) renouvelés chaque jour, d'une part, dans un milieu très riche en substances nutritives (bouillon de viande peptonisé), d'autre part, dans un milieu très pauvre (extrait aqueux à 10 p. 100 de blanc d'œuf cuit), et il a remarqué que, dans le premier cas, la virulence du microbe pour les rats se conservait moins longtemps que dans l'autre.

Il est évident que cette différence dans la durée de la virulence doit être attribuée principalement, sinon exclusivement, à la différence de rapidité avec laquelle les microbes se multiplient dans les deux cas. Pour un temps donné, le nombre des générations successives sera beaucoup plus grand dans le

(1) Il est à noter que les cultures en milieu de Merechkowsky conservées en ampoules scellées à 37° sont stérilisées déjà après 8 à 10 mois.

bouillon riche que dans le bouillon pauvre, et pour le même nombre de générations le résultat serait très probablement identique.

Le *bac. typhi murium* B. est inoffensif par ingestion pour tous les autres animaux, mais il tue les cobayes inoculés dans le péritoine et les lapins inoculés dans les veines.

DOSAGE DE LA VIRULENCE POUR LES SOURIS BLANCHES

[I. — INOCULATION SOUS LA PEAU.]

Avec une culture de 24 heures en bouillon peptonisé, on fait une série de dilutions de 1 p. 2.500 à 1 p. 1 milliard, on inocule sous la peau chaque dilution à 3 souris, à la dose de 1 cent. cube pour chaque souris, et, en même temps, pour se rendre compte de la quantité de microbes injectés, on ensemence 1 cent. cube de chaque dilution sur plusieurs plaques de gélose.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

EXP. 1.	DILUTIONS	SOURIS MORTES EN	NOMBRE DE COLONIES
	—	—	—
	1 pour 2.500 . . .	3 à 4 jours	innombrables
	1 pour 25.000 . . .	3 à 4 jours	innombrables
	1 pour 250.000 . . .	7 à 8 jours	innombrables
	1 pour 500.000 . . .	4 à 5 jours	plus de 40.000
	1 pour 1 million .	4 à 6 jours	17.000
	1 pour 2 millions.	5 à 6 jours	3.000
	1 pour 5 millions.	5 à 6 jours	1.600
	1 pour 10 millions.	5 à 6 jours	600
	1 pour 20 millions.	7 à 8 jours	270
	1 pour 40 millions.	4 à 5 jours	130
	1 pour 100 millions.	4 à 5 jours	60
	1 pour 1 milliard.	Sur 6 souris, 4 meurent en 5 à 8 jours; 2 survivent.	10 à 30

II. — INFECTION PAR INTRODUCTION DE MICROBES DANS LA BOUCHE.

Avec la même culture qui a servi à l'expérience précédente, on fait des dilutions dont 0,05 cent. cube correspond à 1 cent. cube des dilutions à 1 p. 2.500, 25.000, 250.000, 500.000 et 5 millions, et on introduit 0,05 cent. cube de cha-

cune de ces dilutions dans la bouche de chaque souris à l'aide d'une canule appropriée.

EXP. 2.	DILUTIONS	NOMBRE DES SOURIS	RÉSULTATS
1 pour	2.500. . .	3	mortes en 4 à 8 jours.
1 pour	25.000. . .	3	mortes en 5 à 12 jours.
1 pour	250.000. . .	3	mortes en 5 à 12 jours.
1 pour	500.000. . .	13	5 souris mortes en 5 à 8 jours, 8 restent vivantes.
1 pour	5 millions .	13	toutes restent vivantes.

La dose minima mortelle serait donc un peu plus grande que 1 cent. cube d'une dilution à 1 p. 500.000, c'est-à-dire qu'il faut introduire dans la bouche de l'animal environ 40.000 microbes pour qu'un certain nombre de ces microbes (au moins 10 à 30) puissent pénétrer dans le sang et donner à l'animal une infection mortelle. Nous avons constaté, en effet, en prélevant et en ensemençant sur gélose quelques gouttes de sang de toutes les souris en expériences, que le sang des souris qui ont fini par succomber contenait toujours des microbes en plus ou moins grande quantité, tandis que celles qui ont survécu ont donné toujours desensemencements stériles.

Il est donc plus que probable que les souris qui ont survécu ont réussi à détruire dans la bouche et dans le tube digestif tous les microbes ingérés et échappèrent ainsi à l'infection proprement dite.

Ces mêmes souris infectées à nouveau 15 jours plus tard de la même manière, mais avec une dose de microbes plus forte, ont succombé en même temps que les témoins.

III. — INFECTION AVEC DU PAIN MOUILLÉ AVEC DES CULTURES VIRULENTES.

Une culture préparée de la même façon que précédemment est diluée à 1 p. 50, 500, 5.000, 50.000 et 500.000. On fait absorber 2 cent. cubes de chacune de ces dilutions par 2 petits cubes de pain et on donne à manger ces 2 petits cubes à chaque souris. Toutes les souris sont placées une à une dans des bocaux séparés, et privées de toute autre nourriture pendant 24 heures. Dans tous les bocaux le pain ainsi préparé a été mangé complètement.

Exp. 3.	DILUTIONS	NOMBRE DES SOURIS	RÉSULTATS
	1/50	3 souris	mortes en 5 jours.
	1/500	3 souris	mortes en 5 jours.
	1/5.000	3 souris	mortes en 6 jours.
	1/50.000	3 souris	2 souris mortes en 6 jours, 1 souris reste vivante.
	1/500.000	3 souris	toutes restent vivantes.

La dose minima mortelle pour du virus mélangé avec du pain serait donc à peu près égale à 1 cent. cube d'une dilution à 1 p. 25.000, soit plusieurs millions de microbes. Il est donc certain que, dans ce cas, l'immense majorité de microbes périssent dans les différents changements de milieu qu'on leur fait subir, dans le pain avant que les souris l'aient mangé et ensuite dans le tube digestif.

Le nombre de microbes nécessaires pour tuer les souris par les différents modes d'infection que nous venons d'indiquer n'est, bien entendu, que très approximatif, et il n'est guère possible de chercher dans ces expériences une précision plus grande; mais on peut dire que, si pour l'infection par inoculation sous la peau la dose sûrement mortelle est de quelques unités, ou de quelques dizaines de microbes, il en faut quelques milliers pour produire le même effet, quand on introduit la culture telle quelle dans la bouche et quelques millions quand on la donne à manger avec du pain.

ESSAIS DE VACCINATION

Nous avons vu plus haut que les *bac. typhi murium* donnent aux petits rongeurs une maladie présentant quelques analogies avec la fièvre typhoïde ou paratyphoïde de l'homme; il nous a donc semblé intéressant de rechercher s'il est possible de vacciner ces animaux contre cette maladie ou les en guérir par un sérum spécifique, et surtout s'il est possible d'apprécier la valeur d'un vaccin ou d'un sérum pour une maladie naturelle d'après son action sur les maladies artificielles provoquées par l'inoculation du virus typhique sous la peau ou dans le péritoine.

De nombreuses expériences ont montré qu'il est possible de vacciner les cobayes contre une inoculation mortelle du *bac. d'Eberth* et qu'un sérum suffisamment actif peut les en guérir,

et Brückner [6] a pu vacciner avec succès les souris blanches contre un paratyphique B qui les tuait par injection sous-cutanée à la dose de 0,1 cent. cube de culture et était avirulent par ingestion. Brückner a nourri 16 souris pendant 9 jours de suite, avec des aliments trempés dans une culture de ce paratyphique B. Une seule souris a succombé pendant la vaccination et son sang a donné une culture de paratyphique.

Les survivantes et 10 souris témoins avaient été injectées ensuite avec une dose mortelle du même microbe. Une seule des souris traitées est morte en même temps que les témoins, toutes les autres ont survécu.

Les résultats que l'on obtient en cherchant à immuniser les souris ou les rats contre les paratyphiques naturellement pathogènes sont loin d'être aussi favorables.

Lœffler [7] a essayé d'abord de vacciner des souris en les nourrissant plus ou moins longtemps avec des émulsions de son *bac. typhi murium* chauffées à 70 degrés. Il a obtenu les résultats suivants :

8 souris ont reçu à manger ces émulsions 17 fois en 29 jours.

De ces 8 souris, 4 sont mortes pendant la vaccination, 1 avait été sacrifiée pour l'étude des propriétés agglutinantes de son sérum ; des 3 dernières, contaminées une première fois, 18 jours après la dernière vaccination, 1 a succombé le 11^e jour, les 2 autres ont survécu à cette première infection, mais ont succombé à une deuxième contamination faite 7 jours après la première.

En même temps Lœffler vaccinait des campagnols par inoculation avec les mêmes microbes séchés et chauffés à sec à 120 degrés pendant 2 heures ou à 150 degrés pendant 1 heure.

Le produit ainsi obtenu s'est montré très toxique, une dose supérieure à 0,1 milligramme inoculée sous la peau tuait tous les campagnols.

Tous les animaux vaccinés deux fois à 3 semaines d'intervalle et contaminés 18 jours après la deuxième vaccination ont succombé en même temps que les témoins.

Le même savant a réussi plus tard [8] à vacciner avec succès quelques souris en leur injectant à plusieurs reprises un virus séché et tué par un chauffage à 75 degrés pendant 7 à 8 jours. Les souris ainsi traitées ont supporté ensuite 10 doses mortelles du même virus vivant inoculé sous la peau, mais nous verrons

plus loin que le même traitement appliqué aux souris avec notre virus, nous a donné des résultats moins favorables.

Eijiro Yoshida [9] a cherché à immuniser les souris et les campagnols contre le *bac. typhi murium* de Loeffler en les nourrissant pendant 1 à 30 jours avec les cultures d'un paratyphique B vivantes, mais non virulentes.

Sur 24 souris ainsi traitées, 7 ont résisté à une première infection et 3 de ces 7 à une deuxième infection.

La même expérience répétée avec le paratyphique A et le *bac. d'Eberth*, pris comme vaccins, lui a donné toujours des résultats négatifs.

Les essais de vaccination par des injections sous-cutanées, répétées 3 fois à 10 jours d'intervalle, du même paratyphique B, n'ont donné aucun résultat quand on infectait les souris par la bouche, mais ont permis de sauver quelques souris inoculées sous la peau.

M^{lle} Edna Steinhardt et M. Th. Tournoy [10] ont fait sur le même sujet une longue série d'expériences avec le *bac. Danysz*.

Ils ont trouvé qu'il est impossible de vacciner les souris, mais que l'on peut immuniser une certaine proportion de rats.

Les résultats de ces expériences indiquent donc nettement que, s'il est possible d'immuniser les souris contre un virus qui ne les tue que par inoculation sous la peau, il est presque impossible de les vacciner contre un microbe naturellement pathogène et que, dans ce dernier cas, l'infection par la bouche est aussi dangereuse que l'infection par inoculation sous la peau.

Toutefois, en considérant la très grande virulence du *bac. typhi murium* pour les petits rongeurs, nous avons pensé que, dans les travaux que nous venons de résumer, on n'a pas suffisamment tenu compte de ce fait et il nous a semblé intéressant de répéter ces expériences, en éprouvant les animaux traités par des vaccins, par des doses *limites mortelles* (exp. 1, 2 et 3, pour nous rapprocher autant que possible des conditions dans lesquelles un animal peut s'infecter normalement.

Nous avons donc traité des séries de souris blanches par tous les vaccins découverts jusqu'à présent et essayés dans la fièvre typhoïde et notamment :

1° Cultures chauffées en bouillon ou en émulsion dans l'eau physiologique (méthode de Chantemesse) ;

- 2° Cultures tuées par l'éther (méthode de Vincent);
- 3° Cultures sensibilisées (méthode de Besredka);
- 4° Cultures séchées et chauffées à sec (méthode de Lœffler).

VACCINATION AVEC DES CULTURES OU ÉMULSIONS CHAUFFÉES.
(*Méthode de Chantemesse.*)

1° *Traitement par une seule injection d'une culture chauffée en ampoules scellées :* a) pendant 1 heure à 60 degrés; b) pendant 15 minutes à 75 degrés; c) pendant 5 minutes à 100 degrés.

On prépare la même série de vaccins avec une culture en bouillon de 24 heures et, pour éviter les effets toxiques de la peptone, avec une émulsion dans l'eau physiologique d'une culture sur gélose, en prenant soin d'avoir la même quantité de microbes dans les deux cas.

Exp. 4. — *Les doses injectées* étaient de 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 0,8 cent. cube. Pour chaque dose on a pris 2 souris pour la culture en bouillon et 2 souris pour l'émulsion dans l'eau physiologique, — soit 20 souris en tout.

Toutes les souris ont très bien supporté ces injections.

Résultats. — On éprouve 20 jours après, 10 souris par infection par la bouche et 10 souris par inoculation sous la peau. Dans les deux cas, les doses d'épreuve étaient *minima* mortelles.

Résultats. — Les souris traitées sont mortes en même temps que les témoins.

2° *Traitement par deux injections.*

Exp. 5. — On traite 20 souris exactement dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente, avec cette seule différence qu'elles reçoivent 2 injections de vaccin à 15 jours d'intervalle.

Résultats. — Toutes ces souris éprouvées 20 jours après la 2° injection meurent, quelques-unes avec un léger retard sur les témoins.

3° *Le traitement des souris par 3 injections répétées à 15 et 20 jours d'intervalle n'a pas eu plus de succès* (Exp. 6).

Exp. 7. — Dix souris sont nourries pendant 10 jours de suite avec de grandes quantités de microbes tués par un chauffage à 65 degrés pendant 1 heure.

Toutes ces souris ont succombé en même temps que les témoins.

VACCINATION AVEC DES CULTURES TUÉES PAR L'ÉTHER.
(*Méthode de Vincent.*)

Les cultures tuées par l'éther se sont montrées plus toxiques que celles tuées par la chaleur en ampoules scellées. Les doses

de 0,1 cent. cube dans le péritoine et de 0,5 cent. cube sous la peau tuent toutes les souris.

Exp. 8. — Une série de souris sont injectées sous la peau, deux fois à 20 jours d'intervalle, avec 0,1 cent. cube de vaccin, d'autres avec 0,2 cent. cube du même vaccin.

Toutes supportent bien ce traitement.

Résultats. — Une première épreuve (contamination par la bouche avec une dose minima mortelle), faite 25 jours après la dernière injection donne 2 souris mortes sur 6, de celles qui ont reçu deux injections de 0,1 cent. cube de vaccin et toutes celles qui ont reçu 0,2 cent. cube de vaccin.

Les 4 souris qui survivent sont éprouvées 20 jours après par une dose de virus un peu plus forte et meurent en même temps que les témoins.

VACCINATION AVEC DES MICROBES SÉCHÉS ET TUÉS
PAR UNE CHALEUR SÈCHE DE 75 DEGRÉS.
(Méthode de Lœffler.)

Nous avons vu plus haut que Lœffler préparait son vaccin en chauffant le virus, préalablement séché à 75 degrés pendant 7 à 8 jours.

Nous avons constaté que les microbes provenant d'un raclage d'une culture sur gélose, séchés dans le vide sur de l'acide sulfurique et chauffés ensuite à 75 degrés à sec, n'ont jamais pu être tués en si peu de temps, — et que le temps nécessaire pour tuer sûrement tous les microbes dépendait de l'épaisseur de la couche de microbes soumis à ce traitement. Ainsi, il fallait 12 jours pour tuer 1 centigramme de microbes étalés sur une plaque de verre, 15 jours pour 1 décigramme et 35 jours de chauffage pour tuer 1 gramme de microbes étalés de la même façon sur une plaque de verre.

Beaucoup de précision et un contrôle très rigoureux sont donc nécessaires pour préparer ce vaccin qui, bien préparé, n'est pas très toxique.

Les souris en supportent très bien 2 milligrammes en injection sous-cutanée.

Exp. 9. — On injecte deux fois de suite à 15 jours d'intervalle 3 séries de souris avec 0,01 milligramme, 0,1 milligramme et 1 milligramme d'une culture chauffée à sec et émulsionnée ensuite dans l'eau physiologique.

Résultats. — Toutes ces souris sont éprouvées 20 jours après par une première ingestion avec une dose limite mortelle qui a tué 5 souris sur 6. Sur 9 souris vaccinées, 3 meurent en même temps que les témoins, 6 survivent. Ces dernières sont éprouvées une deuxième fois avec une dose dix fois plus forte, elles meurent toutes en même temps que les témoins.

VACCINATION AVEC DES MICROBES SENSIBILISÉS SÉCHÉS
ET TUÉS ENSUITE PAR UNE CHALEUR SÈCHE DE 75 DEGRÉS.
(Méthode de Besredka modifiée.)

Les essais de vaccination par les cultures virulentes sensibilisées à l'aide d'un sérum qui les agglutinait dans des dilutions à 1^e p. 2.000 ne nous ont donné aucun résultat appréciable. Les microbes restaient toujours agglomérés, de sorte que, dans les dilutions plus fortes que 1 p. 10 millions, les mêmes quantités de liquide étaient tantôt mortelles, tantôt ne produisaient aucun effet, et, comme les souris qui ont bien supporté la première injection succombaient souvent à la seconde, il n'était guère possible de savoir si, à la première injection, elles ont bien reçu quelques microbes sous la peau ou non. D'ailleurs, toutes les souris qui ont survécu à une ou deux de ces injections sont mortes plus tard à la suite de l'infection d'épreuve.

Toutefois, comme la méthode de *Loeffler* semblait donner des résultats un peu meilleurs que les deux méthodes précédentes, nous avons eu l'idée de la combiner avec celle de *Besredka*, c'est-à-dire de dessécher et de chauffer à sec des microbes préalablement sensibilisés.

Exp. 10. — On injecte 9 souris, deux fois à 15 jours d'intervalle avec 0,01 milligramme, 0,1 milligramme et 1 milligramme du vaccin ainsi préparé
1^{re} épreuve par infection par la bouche avec une dose limite mortelle : 1 souris meurt, 8 survivent.

2^e épreuve, 17 jours après la précédente avec une dose de virus dix fois supérieure : 7 souris meurent en même temps que les témoins, 1 seule souris survit.

De cette série d'expériences on peut donc conclure qu'avec les méthodes que nous venons d'indiquer, la vaccination des souris contre le bac. typhi murium, type B, n'est pas pratiquement possible; mais, en comparant les résultats obtenus par les quatre méthodes essayées, on est obligé de reconnaître que c'est le virus chauffé à sec, et surtout le virus chauffé à sec et préalablement sensibilisé, qui donne les résultats les meilleurs.

Les souris traitées par cette dernière méthode résistent, en effet, presque toutes à une première infection et une sur huit a

résisté à une deuxième infection plus sévère, tandis que le virus chauffé en ampoules a donné des résultats absolument négatifs et le virus tué par l'éther n'a vacciné que 2 souris sur 12 contre une première infection, mais n'a empêché la mort d'aucune des survivantes soumises à une deuxième infection plus sévère.

VACCINATION DE RATS

Les résultats à peu près négatifs de nos essais de vaccination de souris sont dus probablement à ce fait que les souris sont d'une sensibilité pour ainsi dire absolue à l'action de ce virus. L'injection de quelques microbes suffit pour les tuer et, sur des milliers de souris que nous avons sacrifiées pour les essais de virulence de nos cultures, nous n'en avons pas vu une seule guérir après une infection certaine, — c'est-à-dire après que son sang avait été envahi par les microbes.

Nous avons, par contre, observé quelquefois des cas de maladie incontestables suivis d'une guérison spontanée chez les rats, et il était naturel d'en conclure que ces animaux, capables de combattre victorieusement cette infection, seraient aussi plus faciles à vacciner que les souris.

La virulence de nos cultures pour les rats est de beaucoup moindre que pour les souris, et, comme les rats d'égout que l'on peut se procurer à Paris ont pu vivre dans des milieux fort différents et acquérir des sensibilités aux infections très variables, un dosage de la virulence aussi exact que celui que nous avons établi pour les souris était à peu près impossible.

Toutefois, une longue série d'essais nous a permis de constater qu'une dose de 0,01 cent. cube d'une culture de 24 heures inoculée sous la peau était sûrement mortelle, et qu'une dose de 0,4 cent. cube de la même culture introduite dans la bouche tuait 95 rats sur 100.

Contrairement à ce que nous avons vu chez les souris, les humeurs de rats sont donc capables de détruire un grand nombre de microbes, fait que nous avons pu confirmer en soumettant ces derniers *in vitro* à l'action du sérum de souris et du sérum de rat. — Nous avons constaté que le sérum de souris favorisait le développement des microbes, tandis que le sérum de rats s'est montré fortement bactéricide.

Vaccination par des cultures chauffées en ampoules pendant une heure à 60 degrés.

Exp. 11. — 10 rats gris reçoivent sous la peau 0,1 cent. cube de vaccin deux fois de suite à 15 jours d'intervalle.

Éprouvés 15 jours plus tard, ils meurent tous en 2 à 21 jours.

Vaccination par les cultures tuées par l'éther.

Exp. 12. — L'expérience faite exactement dans les mêmes conditions que la précédente a donné aussi exactement les mêmes résultats.

Ces deux modes de vaccination ont donc donné des résultats complètement négatifs.

Vaccination par des microbes séchés et chauffés à sec.

Exp. 13. — 10 rats reçoivent sous la peau deux injections, à 15 jours d'intervalle, de 4 milligrammes de culture séchée et chauffée pendant 35 jours à 75 degrés.

Pour éprouver la toxicité de ce vaccin, on injecte à 3 rats, une seule fois, respectivement 4, 6 et 10 centigrammes de la même culture.

Ces doses énormes sont très bien supportées, les animaux inoculés présentent des œdèmes plus ou moins étendus à l'endroit de l'injection, mais ces réactions locales ne sont pas douloureuses et ne sont le siège d'aucun processus inflammatoire.

Tous ces rats sont éprouvés : les 10 premiers 20 jours après la deuxième injection, les 3 derniers 35 jours après l'injection du vaccin. Ils reçoivent tous 0,4 cent. cube d'une culture de 24 heures dans la bouche.

Des 10 premiers, 8 rats meurent en 8 à 11 jours, 2 survivent, des 3 derniers 1 survit.

Vaccination par injection d'une faible dose de culture vivante.

Exp. 14. — 10 rats reçoivent dans la bouche 0,1 cent. cube d'une dilution au centième d'une culture de 24 heures. Un de ces rats meurt 3 jours, un autre 19 jours après cette injection. Tous les deux ont du virus dans le sang.

Les 8 survivants sont éprouvés 25 jours après l'injection par 0,4 cent. cube d'une culture de 24 heures dans la bouche. 4 de ces rats meurent en 2, 4, 8 et 13 jours, les 4 autres survivent.

Cette méthode de vaccination (virus vivant) donne donc des résultats moins bons que la vaccination par les microbes séchés et tués par la chaleur sèche et présente, en outre, l'inconvénient d'être moins précise. Il est impossible de savoir si les rats qui ont résisté à l'épreuve n'étaient pas réfractaires à l'action du virus.

Les essais de traitement préventif ou curatif des souris par un sérum d'animaux fortement immunisés n'ont pas eu de résultats plus heureux que les essais de vaccination. Les sérums de chèvres et de lapins immunisés pendant plus de six mois par des cultures mortes d'abord, et ensuite par des cultures vivantes injectées dans les veines, ne préservait pas les souris à la dose de 1 cent. cube contre une infection simplement mortelle.

VACCINATION DES COBAYES

Pour terminer cette étude, il nous a semblé important d'essayer de vacciner contre ce même paratyphique les cobayes qui, ainsi que nous l'avons vu plus haut, sont complètement réfractaires à l'infection par la bouche et assez sensibles à l'inoculation des microbes dans le péritoine.

EXP. 15. — *Virulence du virus normal.* 5 cobayes de 350 à 400 grammes reçoivent dans le péritoine, respectivement, 1, 0,8, 0,6, 0,4 et 0,1 cent. cube d'une culture en bouillon de 24 heures. Ils meurent, le 1^{er} en 24 heures, les 4 autres en 2, 4, 5 et 6 jours.

EXP. 16. — *Virulence du virus sensibilisé.* 5 cobayes reçoivent chacun 0,1 cent. cube; 4 autres, respectivement, 1, 2, 3 et 5 cent. cubes de virus sensibilisé.

Des 5 premiers, 2 meurent en 6 et 8 jours, 3 survivent.

Les 4 autres meurent en 3, 4, 5 et 6 jours.

Les 3 survivants et 2 témoins reçoivent, 15 jours plus tard, 0,2 cent. cube de virus normal dans le péritoine.

Les cobayes vaccinés survivent, les témoins succombent en 5 et 6 jours.

Ainsi, il a suffi d'une seule injection, il est vrai assez sévère, de virus sensibilisé pour immuniser les cobayes contre une dose sûrement mortelle. Dans ce cas, la vaccination est donc relativement très facile et nous avons constaté aussi qu'il est assez facile d'immuniser les lapins par 1 ou 2 injections de cultures mortes sous la peau contre l'inoculation consécutive de virus vivant dans les veines.

La facilité d'immunisation des animaux *naturellement réfractaires* à une maladie contre une péritonite ou une septi-

cémie artificielle ne permet donc pas de conclure à la possibilité de vaccination par les mêmes méthodes des animaux *naturellement sensibles* à la même maladie.

CONCLUSIONS.

1° Il est impossible de vacciner les souris par les méthodes connues jusqu'à présent contre le *bac. typhi murium*, *type B*, ni de les guérir par un sérum spécifique.

2° On pourrait supposer que cette impossibilité de vaccination est due au manque absolu des moyens de défense naturels de l'organisme de la souris contre l'action du microbe; mais, comme il est presque tout aussi difficile de vacciner les rats, animaux bien moins sensibles, on est obligé d'en conclure que ce fait est dû à une particularité inhérente à la nature du microbe.

3° Il est très facile de vacciner les animaux (cobayes et lapins) réfractaires à l'infection par la bouche ou par piqûre sous la peau contre les inoculations mortelles dans le péritoine ou dans les veines.

4° Il faut donc conclure que la possibilité de l'immunisation des animaux naturellement réfractaires à une maladie contre une infection provoquée artificiellement ne permet pas de conclure qu'il sera possible d'immuniser par les mêmes méthodes les animaux naturellement sensibles à la même maladie.

BIBLIOGRAPHIE

1. MÜHLEUS, DAHM und FÜRST. — Untersuchungen über Bacterien der Enteritisgruppe, etc. *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, Bd XLVIII, 1908.
2. K. HURLER. — Vergleichende Untersuchungen über den B. paratyph. B, den Bac. enteridis und die Rattenbacillen Danysz, Dunbar, Issatchenko, Neumann. *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, Bd LXIII, p. 341.
3. J. DANYSZ. — Un microbe pathogène pour les rats. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, p. 193.
4. DUJARDIN-BEAUMETZ. — Transmission de la péripneumonie des bovidés aux espèces ovine et caprine. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, p. 449.
5. S. S. MERESCHKOWSKY. — Ein neuer Nährboden auf dem der Bac. Danysz selbst nach langdauernden, fortlaufenden Ueberimpfungen seine Virulenz nicht verliert. *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, Bd LXV, 1912, p. 393, 400 et 482.

S. S. MERESCHKOWSKY. — Die Beeinflussung der Virulenz des Bac. Danysz durch fortlaufende Ueberimpfungen in Bouillon. *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, Bd LXII, 1912, p. 64.

6. G. BRÜCKNER. — Ueber orale Immunisirungsversuche, *Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig.*, Bd VIII, 9 janvier 1911, p. 439.

7. F. LOEFFLER. — Ueber Immunisierung per os. *Leuthold Festschr.*, Bd I.

8. F. LOEFFLER. — Die Verwendung von trockenerhitzten Microorganismen, etc. *Deutsche med. Woch.*, 29 mai 1913, p. 1025.

9. EIJIRO YOSHIDA. — Ueber Immunisierung per os. *Arch. f. Hyg.*, Bd LXIX, 1909, p. 21.

10. EDNA STEINHARDT and THOMAS FLOURNOY. — The effect of specific vaccines on Rat Typhoid. *The Journal of infectious Diseases*. Vol. IX, 1911, p. 229.

Le Gérant : G. MASSON.

Paris — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

